

**Einschlussverbindungen von Fomocain  
und neuen Fomocain-Derivaten  
zur parenteralen und nasalen Applikation**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Janett Wennek-Klose  
geboren am 21.07.1973 in Sangerhausen

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Tag der Doktorprüfung:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Dezember 1997 bis Dezember 2002, unterbrochen von einer einjährigen Elternzeit, im Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Anleitung von Prof. Dr. Dres. h.c. H. Oelschläger angefertigt.

Meinem Doktorvater

*Herrn Prof. Dr. Dres. h.c. H. Oelschläger*

danke ich dafür, dass er mir die Anfertigung der Dissertation ermöglicht hat. Für die Auswahl und Überlassung des Themas bin ich ihm verbunden. Seine wertvollen Anregungen, sowie die stete Unterstützung und Förderung waren wichtige Grundlagen für den Erfolg dieser Arbeit.

Ferner gilt mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. C. Fleck und seinen Mitarbeitern im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena, die durch ihre tierexperimentellen Untersuchungen einen wesentlichen Beitrag zu meiner Arbeit leisteten.

Darüber hinaus möchte ich den Mitarbeitern am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie danken, die mich bei vielen Details meiner Arbeit unterstützt haben. Ferner danke ich Herrn Apotheker J. Wange für die kritische Durchsicht der Dissertation und Frau M. Listing für die Synthese des Untersuchungsmaterials. Besonderer verbunden bin ich Herrn Apotheker Dr. W. Köhler für steten freundschaftlichen Rat.

Besonderer Dank gebührt meiner Familie, ohne deren Liebe, Unterstützung und Geduld mir die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **Dolor Tyrannos**

**Und Dolor Tyrannos also sprach:**

**„Ihr lieben Ärzte, gemacht, gemacht,  
Immer enger wollt ihr mich umziehn  
Mit Opium, Morphium, Kokain  
Immer reicher stellt sich euch zur Wahl  
Äther, Chloroform, Chloral,  
Und doch, ob Brom, ob Jod, ob Od,  
Der Schmerz ist ewig wie der Tod.“**

**Theodor Fontane**

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. Lokalanästhetika .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1.1. Geschichte der Lokalanästhesie   |           |
| 1.1.2. Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Lokalanästhetika                         |           |
| 1.1.3. Wirkungsmechanismus am Natriumkanal  |           |
| <b>1.2. Cyclodextrine .....</b>   | <b>9</b>  |
| 1.2.1. Geschichtlicher Hintergrund  |           |
| 1.2.2. Struktur und Eigenschaften der Cyclodextrine                               |           |
| 1.2.3. Pharmakologische und toxikologische Eigenschaften der Cyclodextrine        |           |
| 1.2.4. Anwendung der Cyclodextrine  |           |
| 1.2.5. Chemisch modifizierte Cyclodextrine  |           |
| 1.2.6. 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin                                     |           |
| <b>2. Problemstellung .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>3. Ergebnisse und Diskussion .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>3.1. Fomocain in einer parenteralen Zubereitung .....</b>                      | <b>19</b> |
| 3.1.1. Löslichkeitserhöhung   |           |
| 3.1.2. Bildung einer Einschlussverbindung   |           |
| 3.1.3. Charakterisierung der Einschlussverbindung                                 |           |
| 3.1.3.1. Bestimmung der Viskosität  |           |
| 3.1.3.2. Bestimmung des Verhältnisses Fomocain-Base:2-HP- $\beta$ -CD             |           |
| 3.1.3.3. Stabilität der Zubereitung   |           |
| 3.1.3.4. Einfluss von 2-HP- $\beta$ -CD auf die Plasmaproteinbindung des Fomocain |           |
| 3.1.3.5. Pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen                            |           |
| <b>3.2. Fomocain-Analoga in einer parenteralen Zubereitung .....</b>              | <b>40</b> |
| 3.2.1. Physikalisch-chemische Parameter   |           |
| 3.2.1.1. Bestimmung der Löslichkeit   |           |
| 3.2.1.2. Bestimmung der pK <sub>a</sub> -Werte                                    |           |
| 3.2.1.3. Bestimmung der Trübungs-pH-Werte   |           |
| 3.2.1.4. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten                                  |           |
| 3.2.2. Ergebnisse der Biopharmazeutischen Untersuchungen                          |           |
| 3.2.2.1. Bindung der Derivate an Plasmaproteine                                   |           |
| 3.2.2.2. In-vitro Metabolisierung   |           |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.3. Die ausgewählten Derivate OE 7000 und OE 9000   |           |
| 3.2.3.1. Bestimmung der CMC durch konzentrationsabhängige pH-Wert-Messung  |           |
| 3.2.3.2. Bestimmung der Stabilität der Lösungen  |           |
| 3.2.3.3. Enzymatischer Abbau der Substanzen  |           |
| 3.2.3.4. Zubereitung der Substanzen in 2-HP- $\beta$ -CD   |           |
| 3.2.3.5. Pharmakologisch-toxikologische Parameter  |           |
| <b>4. Experimenteller Teil .....</b>   | <b>60</b> |
| <b>4.1. Experimente zur Verbesserung der Löslichkeit der Fomocain-Base .....</b>                                   | <b>60</b> |
| 4.1.1. Salzbildung   |           |
| 4.1.2. Bildung von Mischmizellen   |           |
| 4.1.3. Verwendung von Lösungsvermittlern   |           |
| 4.1.4. Bildung einer Einschlussverbindung  |           |
| <b>4.2. Einschlussverbindung von Fomocain in 2-Hydroxypropyl-<math>\beta</math>-cyclodextrin .....</b>             | <b>67</b> |
| 4.2.1. Synthese unterschiedlich substituierter 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine                             |           |
| 4.2.2. Analytik unterschiedlich substituierter 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine                             |           |
| 4.2.3. Auswirkungen des Substitutionsgrades auf die Einschlussverbindung   |           |
| 4.2.4. Auswirkungen von Wasserstrukturbrechern- und bildnern auf die<br>Einschlussverbindung                       |           |
| <b>4.3. Charakterisierung der Einschlussverbindung von Fomocain und der Derivate OE<br/>7000 und OE 9000 .....</b> | <b>74</b> |
| 4.3.1. Einschlussverbindungen von OE 7000 und OE 9000  |           |
| 4.3.2. Stabilitätsuntersuchungen   |           |
| 4.3.3. Viskosität  |           |
| 4.3.4. Bindungskonstanten  |           |
| 4.3.5. Einfluss von 2-HP- $\beta$ -CD auf biochemische Parameter   |           |
| 4.3.6. Pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen   |           |
| <b>4.4. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Fomocain-Analoga .....</b>  | <b>80</b> |
| 4.4.1. Bestimmung der Löslichkeit  |           |
| 4.4.2. Bestimmung der pK <sub>a</sub> -Werte   |           |
| 4.4.3. Bestimmung der Trübungs-pH-Werte  |           |
| 4.4.4. Berechnung der Wasserlöslichkeit der Basen  |           |
| 4.4.5. Bestimmung von Verteilungskoeffizient (P) und Distributionkoeffizient (D)                                   |           |
| 4.4.6. Bestimmung der Schmelzpunkte  |           |

---

|   |            |
|---|------------|
| 4.4.7. Bestimmung der Stabilität wässriger Lösungen von OE 7000 und OE 9000 |            |
| 4.4.8. Bestimmung der CMC durch konzentrationsabhängige pH-Wert-Messung     |            |
| <b>4.5. Biopharmazeutische Untersuchungen .....</b>                         | <b>88</b>  |
| 4.5.1. Bestimmung der Plasmaeiweißbindung                                   |            |
| 4.5.2. In-vitro Metabolisierung   |            |
| <b>4.6. Elektrochemische Verfahren .....</b>                                | <b>96</b>  |
| <b>4.7. Chromatographische Verfahren .....</b>                              | <b>96</b>  |
| <br>  |            |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>   | <b>98</b>  |
| <b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>                                       | <b>109</b> |
| <b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>   | <b>111</b> |
| <b>8. Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>113</b> |

**1. Einleitung****1.1. Lokalanästhetika****1.1.1. Geschichte der Lokalanästhesie**

Seit vielen Jahrhunderten werden Versuche unternommen, begrenzt Schmerzen auszuschalten. Schon in der „Ilias“ von Homer gibt es Hinweise auf ein lokales Betäubungsmittel: „... dann streut es bittere Wurzel drauf, mit den Händen zermalmt, die Lindernde, welche die Schmerzen alle bezwang ...“. In früherer Zeit kamen zur Erzielung einer Anästhesie eher physikalische Verfahren zum Einsatz. Die Abschnürung von Extremitäten soll bereits ägyptischen Chirurgen des Altertums bekannt gewesen sein und gewann in der Renaissance erneut an Bedeutung. Anfang des 19. Jahrhunderts galt die Methode der Druckanästhesie als allgemein gebräuchlich. Erste Berichte zum Verfahren der Kälteanästhesie, auch „Vereisung“ genannt, gehen auf SEVERINO (1646) und BARTOLINUS (1667) zurück, die Schnee und Eis verwendeten. Mitte des 19. Jahrhunderts, als Äther- und Chloroformanästhesie zur Narkotisierung schon bekannt waren, wurde die Abkühlung von Gewebe zur Unterstützung von operativen Eingriffen genutzt. Die Kälteanästhesie hat trotz ihrer nur kurzen Wirkungsdauer bis heute nicht ganz an Bedeutung verloren. Sie kommt unter Anwendung von Ethylchlorid enthaltenden Sprays vorwiegend bei Sportverletzungen zum Einsatz.

Das 19. Jahrhundert datiert den Anfang der medikamentösen Regionalanästhesie und damit den eigentlichen Durchbruch zur lokalen Bekämpfung bzw. Verhinderung von Schmerzen. Die allgemein schmerzlindernde Wirkung der Opiate, besonders des Morphins, war bekannt. So versuchten LUNDY, TAYLOR und WASHINGTON 1839 punktierte Haut durch Einspritzen von Morphinlösung schmerzunempfindlich zu machen. Doch nicht nur der zu injizierende Stoff sondern auch die Injektionsgeräte mussten vervollkommen werden. Die Hohlkanüle erfand WOOD 1853.

Die Kunde vom Kokastrauch *Erythroxylum coca* kam durch PIZZARO und dessen Söldner 1532 nach Europa, welche während der Eroberung Perus mit Coca in Berührung kamen. Doch erst im 19. Jahrhundert gelangte ausreichend Material an Cocablättern nach Europa, um damit Untersuchungen anzustellen. GADECKE isolierte 1855 ein Alkaloidgemisch aus der Pflanze. Die Isolierung des Hauptalkaloids gelang 1859 NIEMANN und LOSSEN in Göttingen. Sie nannten es Cocain. Die Aufklärung der



Struktur sowie die Totalsynthese des Cocains verdanken wir dem deutschen Chemiker WILLSTÄTTER (1888).

In den Publikationen der Folgezeit finden sich Hinweise auf die lokalanästhetische Wirkung von Cocainlösungen auf der Zunge bzw. ein Bericht über einen Tierversuch mit völliger Anästhesie des Oberschenkels eines Ochsenfrosches. Medizinische Konsequenzen ergaben sich erst 1884 als der Wiener Augenarzt KOLLER nach Tierversuchen erstmals Cocain bei einer Kataraktoperation verwendete. KOLLER hatte, angeregt durch FREUD, welcher selbst schon die Wirkung auf Zunge und Mundschleimhaut beobachtet hatte, vorher an Ochsenfröschen mit dieser Substanz experimentiert. Bereits im Jahre 1885 wurde Cocain nicht nur topisch verwendet sondern auch in die Haut injiziert. HALSTED und HALL injizierten mit positiven Ergebnissen Cocainlösungen in immer tiefere Hautschichten und letztendlich gelang die direkte Anästhesie des Nervus ischiadicus. HALSTED gilt als Erfinder der Leitungsanästhesie, da er sich selber Cocainlösungen spritzte, um seine Zahnschmerzen zu beseitigen. Die Entdeckung der Lumbalanästhesie durch BIER war die Weiterentwicklung und Vervollkommnung der Leitungsanästhesie. Die Folge des medizinischen Fortschritts, der Entdeckung und Anwendung des Cocains, war, bedingt durch die damals übliche Praxis des Selbstversuchs, eine zunehmende Häufung von Cocainabhängigkeit bei Ärzten bis hin zu Todesfällen.

Die zuerst synthetisierten Lokalanästhetika mussten wegen Gewebeunverträglichkeit und einer Reihe von Nebenwirkungen verworfen werden. Erst 1902 kam der Erfolg mit dem Ethylester der 4-Aminobenzoessäure, Benzocain (INN), als Oberflächenanästhetikum, das auch heute noch im EuAB monographiert ist. Im Jahr 1904 gelang EINHORN die Darstellung des Procain (INN), welches man als „genauso großen Schritt wie das Erscheinen von Cocain“ feierte. Die Basizität des Procain ermöglicht die Bildung eines in wässriger Lösung neutral reagierenden Hydrochlorids, sodass nun ein parenteraler Applikationsweg zur Verfügung stand. Eine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit, geringe Toxizität und Sterilisierbarkeit seiner Lösungen boten wesentliche Therapievorteile. Wie den meisten synthetisch hergestellten Lokalanästhetika fehlte aber die vasokonstriktorische Wirkung des Cocains. Der Chirurg BRAUN hob diesen Nachteil durch Zusatz des Vasokonstriktors Adrenalin auf. Der Erfolg war die Wirkungsverlängerung einer 1%igen Procainlösung von 15min auf 2 Stunden. Er verwendete auch als erster 1905 Procain zur Spinalanästhesie.

Erst 27 Jahre später wurde mit Tetracain (INN) eine Substanz gefunden, die auf Grund ihrer guten oberflächenanästhetischen Wirkung Cocain vollständig ersetzen konnte, aber bei der parenteralen Applikation relativ toxisch ist.

1943 präsentierten die Schweden LÖFGREN und LUNDQUIST eine Verbindung, die später Lidocain (INN) genannt wurde. Es handelte sich hierbei um ein völlig neues Lokalanästhetikum vom Säureamidtyp, das sich durch zuverlässige Wirkung und geringe Toxizität auszeichnete und ein Jahr später in die Therapie eingeführt wurde. Seine Anwendung erstreckt sich sowohl auf die Infiltrations- und Leitungsanästhesie als auch auf die Oberflächenanästhesie. Parenteral appliziert ist Lidocain ein gutes Antiarrhythmikum der Klasse I<sub>A</sub>. Eine orale Gabe ist wegen des starken first-pass-Effektes fast wirkungslos.

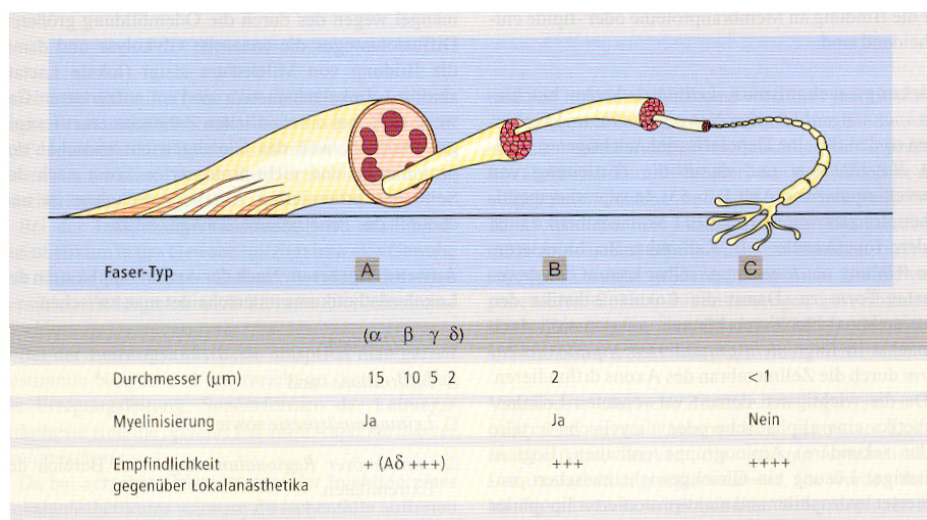
In den folgenden Jahren erschienen weitere Lokalanästhetika, z.B. Chloroprocain (INN, 1955), Mepivacain (INN, 1957), Fomocain (INN, 1957), Prilocain (INN, 1960) und das extrem lang wirkende Bupivacain (INN, 1963). Das vorläufige Ende der Entwicklung ist durch die Markteinführung des chiralen S-Ropivacain (INN, 1997) gekennzeichnet. Während in vielen Arzneistoffgruppen laufend Neuentwicklungen zu beobachten sind, können die LA eher als eine stille Arzneistoffgruppe betrachtet werden. Allerdings zeichnen sich für bewährte Verbindungen neue Einsatzgebiete ab. Hier sind die Neuraltherapie und der Ersatz von Opiaten bei postoperativen Schmerzen durch Zuführung von LA über Katheter im Operationsgebiet zu nennen. Weiterhin ist ein Einsatz als Antimigränikum durch nasale Applikation mit nachfolgender Lähmung des sphenopalatinalen Ganglions für Lidocain beschrieben und für weitere LA, z.B. Fomocain, in der Vorbereitung.

Lokalanästhetika sind neben zentral oder peripher angreifenden Analgetika, Psychopharmaka und Narkosemitteln Verbindungen zur medikamentösen Schmerzausschaltung. Die Vorteile der Lokalanästhesie liegen darin, dass der Patient nur im geringen Maß in seinen vitalen Funktionen beeinträchtigt wird, aufwendige Narkosevorbereitungen entfallen und während des Eingriffes seine Kooperationsfähigkeit vollständig erhalten bleibt. In Deutschland wurden früher 70-90%<sup>1</sup> aller ambulanten Operationen unter Lokalanästhesie vorgenommen. Bezogen auf die Zahl der Anästhesien insgesamt verzeichnet das Universitätsklinikum Gießen eine Anwendung der lokalen Anästhesie von 15%<sup>2</sup>. Allerdings ist in dieser Zahl der Gebrauch von LA in der Zahnmedizin nicht zur Geltung gekommen. Bei kleineren Eingriffen sind LA fast immer Mittel der Wahl und in der Zahnheilkunde absolut unentbehrlich. Kontraindiziert sind sie bei schwerem Schock, bei mit Antikoagulantien behandelten Patienten oder solchen, die an

Blutgerinnungsstörungen leiden bzw. allergisch auf LA reagieren. Nicht zuletzt ist für den Erfolg der Regionalanästhesie die Einstellung des Patienten wesentlich. Daher gilt für den Anästhesisten die Regel: „Überzeuge einen Patienten von der Lokalanästhesie, aber überrede ihn nicht!“

### 1.1.2. Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Lokalanästhetika

Lokalanästhetika heben reversibel und örtlich begrenzt die Erregbarkeit der schmerzvermittelnden sensiblen Endorgane und das Leitungsvermögen der sensiblen Nervenfasern auf<sup>3</sup>. Deren Reizleitung wird in der Abfolge der Reize Schmerz, Geschmack, Wärme/Kälte, Berührung und Druck unterbrochen. Der Grund für diese Reihenfolge ist der unterschiedliche Faserdurchmesser. Die Wirkung von Lokalanästhetika auf dünne schmerzleitende C- und A $\delta$ -Fasern ist deutlich größer als auf die dicken motorischen Fasern vom Typ A $\alpha$  (Abbildung 1).



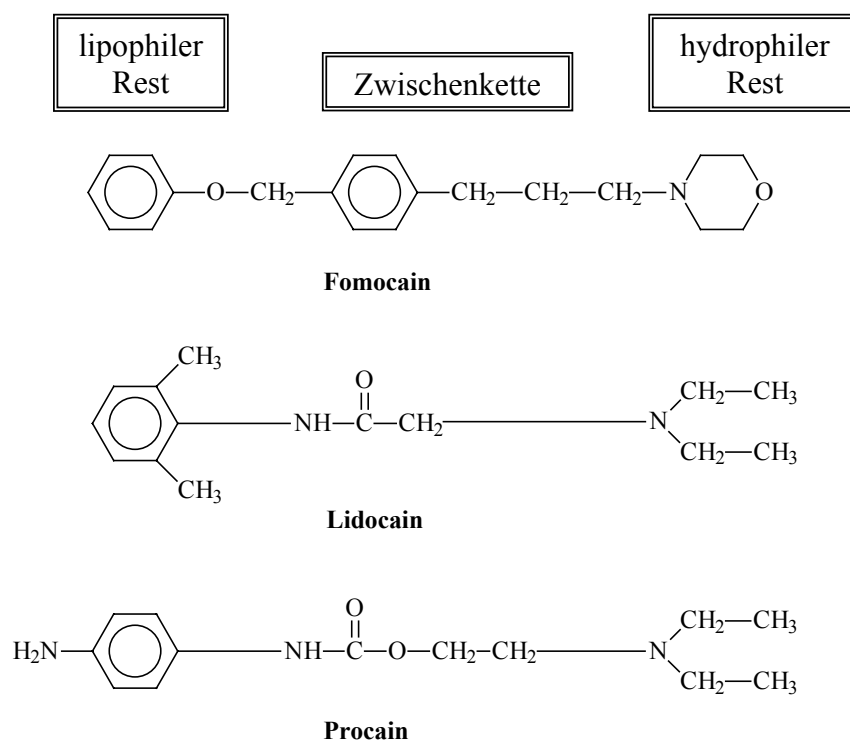
**Abbildung 1** Charakteristika von Nervenfasern (aus Mutschler 2001)

Nach einem erstmals von LÖFGREN beschriebenen Schema können die gebräuchlichsten Lokalanästhetika auf eine in Abbildung 2 dargestellte Grundstruktur zurückgeführt werden, bei der ein lipophiler Rest mit einem hydrophilen Rest über ein Brückenglied verbunden ist. Der hydrophile Anteil ist fast immer eine sekundäre oder tertiäre Aminogruppe, der lipophile Rest aromatischer Natur.

Die Aminogruppe verleiht den Verbindungen einen schwach basischen Charakter. Bedingt durch das freie Elektronenpaar des Stickstoffs ist das Molekül in der Lage, ein Proton zu binden und kann somit entweder in der geladenen, protonierten Form oder als ungeladene

lipophile Base reagieren. Der Stofftransport zum Wirkort, der lipophilen Axonmembran, erfolgt durch Diffusion. Die zu überwindenden Zellmembranen haben ebenfalls Lipidcharakter. Mithin können die Lipidbereiche nur durch die ungeladene, die cytoplasmatischen Bereiche nur durch die geladene Form überwunden werden. Dieser Sachverhalt ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn der pH-Wert des Gewebes bedingt durch entzündliche Prozesse abgesenkt ist. Das Gleichgewicht zwischen protonierter und nicht protonierter Form des Lokalanästhetikums ist dann zum protonierten Anteil verschoben. Es tritt keine oder nur eine schwache Wirkung in Folge verminderten Stofftransports ein. Die Wirkung am Ionenkanal veranschaulicht das Kapitel 1.1.3. (Seite 6).

Die Lipophilie der Substanzen und damit auch ihre Toxizität, Wirkstärke und –dauer werden weitgehend durch die hydrophoben Molekülbestandteile bestimmt. Mit Einschränkungen gilt, je stärker lipophil die Verbindung ist, desto länger die Wirkung, aber auch um so größer ist ihre Toxizität.



**Abbildung 2** Grundstruktur der LA nach Löfgren

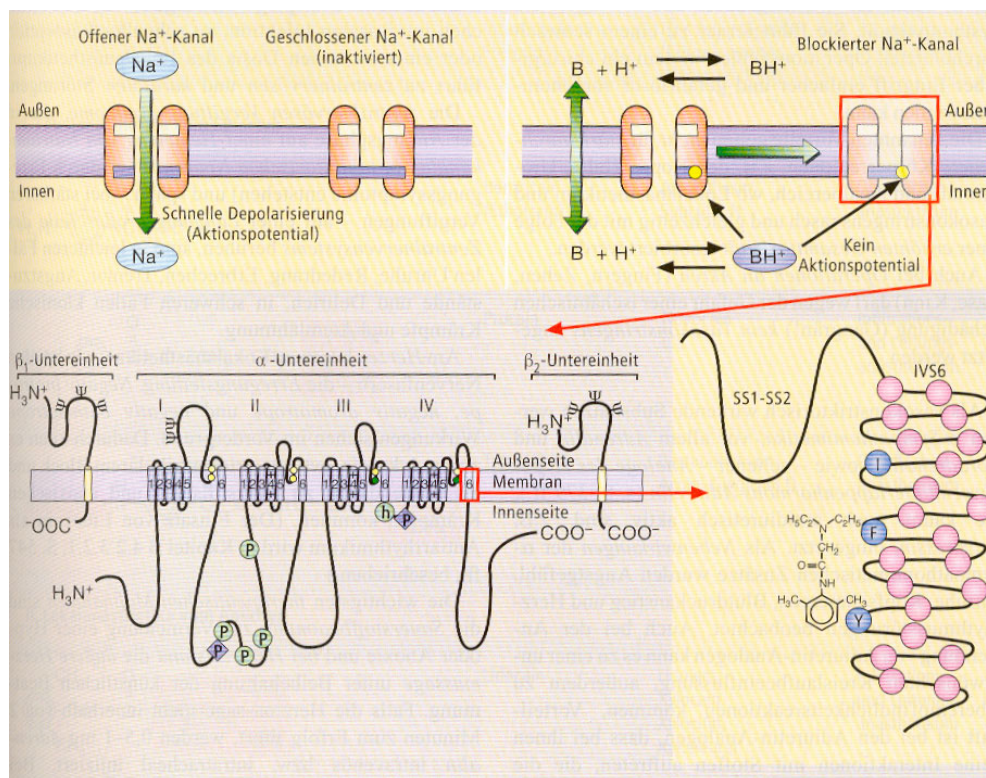
Die lokalanästhetische Wirkung ist jedoch nicht an eine spezifische chemische Struktur gebunden. So gibt es Substanzen, die zwar dem Löfgren-Schema entsprechen aber keinen lokalanästhesierenden Effekt haben und umgekehrt solche, wie den  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-

Antagonisten Yohimbin, der trotz seiner vom Schema abweichenden chemischen Struktur regionale Anästhesie bewirkt.

### 1.1.3. Wirkungsmechanismus am Natriumkanal

Der spannungsabhängige Natriumkanal ist der Wirkort der Lokalanästhetika. Durch die Blockade des Kanals wird der  $\text{Na}^+$ -Einstrom in das Zellinnere verhindert. Das Schwellenpotential für die Auslösung eines Aktionspotentials wird nicht erreicht. Eine Fortleitung der Erregung ist somit nicht mehr möglich. Bei hohen Konzentrationen an LA können auch andere Ionenkanäle, z.B. der Kalium-Kanal, blockiert werden.

Die Struktur der spannungsabhängigen Natriumkanäle ist weitgehend aufgeklärt. Es handelt sich hierbei um aus einer  $\alpha$ -,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit aufgebaute, heterotrimere Proteine (Abb. 3). Die  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus 4 homologen Domänen (I – IV), die zu 6 transmembranären  $\alpha$ -Helices (Segment 1 – 6) gefaltet sind. Dabei bilden die Segmente S5



**Abbildung 3** Schematischer und molekularer Wirkungsmechanismus von Lokalanästhetika (nach Isom et al. und Ragsdale et al.) (aus Mutschler 2001)

und S6<sup>4, 5</sup> die Wand des jeweiligen Kanals. Außerdem enthält jede Domäne im Segment 4 eine geladene Struktur, die auf Potentialschwankungen der Membran reagiert und zu Änderungen der räumlichen Struktur innerhalb des Kanalproteins führt, was ein Öffnen

und Schließen zur Folge hat. In Abhängigkeit vom Membranpotential kann der Kanal demzufolge in verschiedenen Konformations- und Aktivierungszuständen vorliegen:

1. geschlossen, aktivierbar (während des Ruhemembranpotentials)
2. geöffnet, natriumleitfähig (Depolarisationsphase)
3. geschlossen, nicht aktivierbar (Repolarisationsphase).

Verschiedene biophysikalische und molekularbiologische Untersuchungen weisen auf eine Bindungsstelle der Lokalanästhetika in Segment 6 der Domäne IV der  $\alpha$ -Untereinheit hin<sup>6</sup>. So nimmt bei Veränderungen am S6 aus Domäne IV die Wirkung der LA ab<sup>4</sup>. Die Öffnung des Natriumkanals wird dadurch verhindert, dass der Wirkstoff mit den Aminosäuren Phenylalanin (F), Tyrosin (Y) und Isoleucin (I) des Segmentes 6 in Wechselwirkung tritt. Phenylalanin und Tyrosin sind dabei für die Bindung des Lokalanästhetikums verantwortlich, während Isoleucin die Zugänglichkeit von der äußeren Membranseite bestimmt. Offenkundig spielt nach Untersuchungen von OELSCHLÄGER et al. die Aromatizität der LA eine entscheidende Rolle für die Wirkung, weil eine Wechselwirkung mit F und Y eintritt.

Für lokalanästhetisch wirkende Stoffe können auf Grund verschiedener Angriffspunkte am Natriumkanal vier Kategorien unterschieden werden.

Kategorie 1: Bei Substanzen dieser Gruppe handelt es sich um solche, die in der Nähe des äußeren Kanaleingangs an eine spezifische Bindungsstelle andocken und ihn versperren. Die Folge ist eine Dauerdepolarisation des Nervs. Vertreter sind die marinen Toxine Tetrodotoxin und Saxitoxin<sup>7</sup>. Tetrodotoxin ist eine basische Verbindung von adamantanähnlicher Struktur. Das Seeanemonentoxin, ein Polypeptid, wird ebenfalls zu dieser Kategorie gerechnet. Allerdings postuliert man hierfür eine extrazelluläre Bindungsstelle und einen dauerhaft geöffneten Natriumkanal<sup>8</sup>.

Kategorie 2: Um wirken zu können, müssen Substanzen dieser Gruppe erst den Kanal passieren, um dann von der intrazellulären Seite das Bindungsareal zu erreichen. Voraussetzung dafür ist ein geöffneter Natriumkanal, damit die Stoffe mit dem Kanalwasser in die Membran gelangen und festere Bindungen als mit der geschlossenen Form eingehen können. Der Kanal wird durch die Bindung des Moleküls in seiner Konformation geändert und in diesem inaktiven Zustand stabilisiert<sup>9</sup>. In diese Kategorie gehören z.B. das pflanzliche Alkaloid Aconitin und das tierische Steroid-Alkaloid Batrachotoxin.

Kategorie 3: Diese Gruppe bilden apolare Pharmaka unterschiedlicher Struktur, wie Benzocain oder Phenol, die sich reversibel in die Lipidphase der Membran einlagern und durch unspezifische Membranexpansion den Natriumkanal verlegen<sup>10</sup>.

Kategorie 4: In dieser Kategorie werden die therapeutisch relevanten Lokalanästhetika eingeordnet. Sie sind durch die Verknüpfung der Eigenschaften der beiden vorangegangenen Gruppen 2 und 3 gekennzeichnet. Für die Wirksamkeit sind demzufolge hydrophile, protonierbare und lipophile Strukturelemente, wie unter 1.1.2. beschrieben, die Voraussetzung.

## 1.2. Cyclodextrine

### 1.2.1. Geschichtlicher Hintergrund

Cyclodextrine (CD) sind cyclische Oligosaccharide. Sie wurden erstmals im Jahr 1891 von VILLIERS<sup>11</sup> aus einem Kulturmedium von *Bacillus amylobacter* isoliert und von SCHARDINGER 1904 als solche beschrieben<sup>12</sup>. Er beobachtete, dass die von VILLIERS als „Cellulose“ bezeichneten kristallinen Substanzen meist auf stärkehaltigen Medien entstanden. FREUDENBERG erkannte 1938, dass die Glucoseeinheiten der CD  $\alpha$ -1,4-glycosidisch miteinander verknüpft sind<sup>13</sup>. Aber erst im Jahr 1948 gelang durch FREUDENBERG und CRAMER die korrekte Beschreibung der Struktur<sup>14</sup>. Das erste Patent für ein cyclodextrinhaltiges Arzneimittel wurde in Japan im Jahr 1970 eingebracht. Brexin<sup>®</sup>, ein Piroxicam-CD-Komplex kam 1990 in Italien auf den Markt. Im EuAB 4.00 Grundwerk 2002 sind  $\alpha$ -CD (Alfadex<sup>®</sup>) und  $\beta$ -CD (Betadex<sup>®</sup>) monografiert. Das NF 18 führt  $\beta$ -CD.

Neben den natürlichen, kommerziell erhältlichen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrinen existieren mittlerweile eine Vielzahl unterschiedlich substituierter CD, welche zur Lösung pharmazeutisch-technologischer und analytischer Probleme eingesetzt werden.

### 1.2.2. Struktur und Eigenschaften der Cyclodextrine

Am besten charakterisiert sind die kristallinen, homogenen Verbindungen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin, die aus 6, 7 bzw. 8 D-(+)-Glucopyranoseeinheiten aufgebaut sind. Ihre Gewinnung erfolgt durch enzymatischen Abbau von Stärke, meistens Maisstärke. Dabei dienen aus Bakterien (*Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *alcaliphile Bacillen*) isolierbare Cyclodextrin-Glucosyl-Transferasen (CGTasen)<sup>15</sup> als Katalysatoren. Die entstandenen Gemische werden durch selektive Fällungsmittel getrennt und dann gereinigt. Die Strukturen der CD gleichen einem hohlen Kegelstumpf (Torus) (Abb.4). Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass sich die Glucoseeinheiten in der thermodynamisch favorisierten Sessel-Konformation befinden und alle Substituenten äquatorial ausgerichtet sind. Als Folge der stereochemischen Struktur ordnen sich die primären Hydroxylgruppen der Position 6 an der engen Seite des Torus an, während sich die sekundären Hydroxylgruppen der Positionen 2 und 3 an der gegenüberliegenden Seite



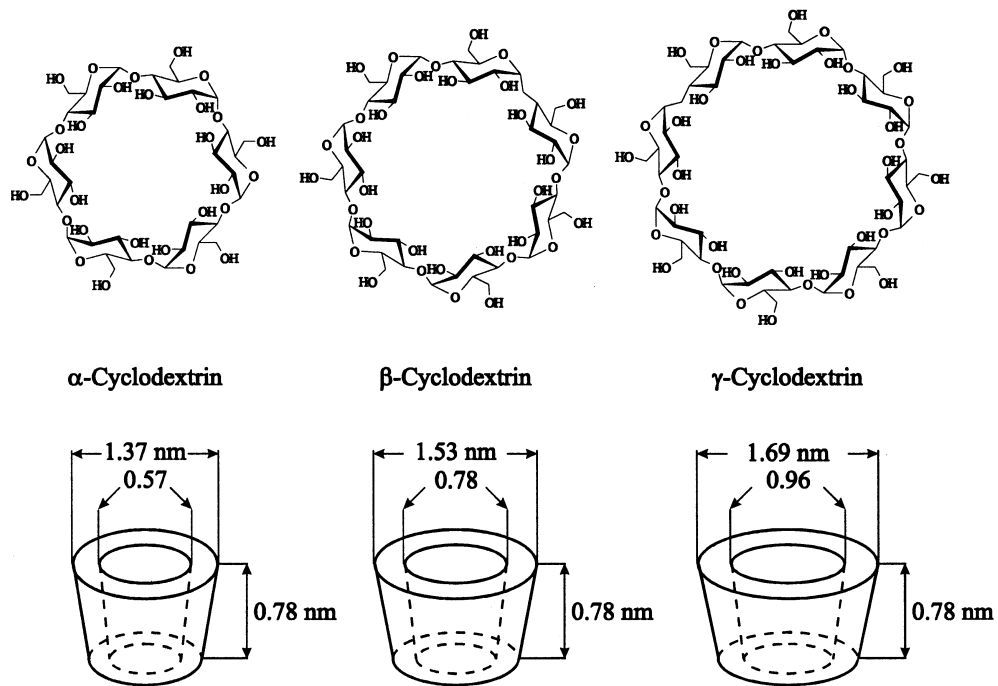


Abbildung 4 Struktur und Größe von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin

befinden<sup>16</sup>. Die Oberfläche der CD wird somit hydrophil. Das Innere der Hohlkörper besitzt durch die glycosidischen Acetalsauerstoffe einen unpolaren Charakter. Lipophile Moleküle lagern sich in Abhängigkeit von ihrer Größe unter Ausbildung von u.a. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder Londonschen Dispersionskräften in die Kavität. Die entstehenden Einschlussverbindungen können dabei verschieden zusammengesetzt sein. Abbildung 5 zeigt exemplarisch sogenannte host-guest Verbindungen.

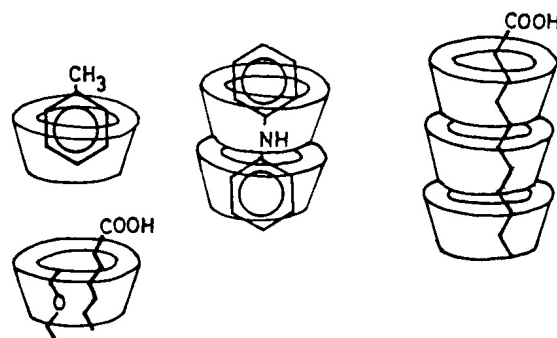


Abbildung 5 Cyclodextrin Einschlussverbindungen mit verschiedenen host-guest Verhältnissen

Ein exakter Schmelzpunkt kann für die drei CD nicht definiert werden. Oberhalb 300°C beginnt die Zersetzung. Gegenüber alkalischen Lösungen sind CD stabil, während sie im sauren in Glucose und lineare Oligosaccharide gespalten werden.

Die enzymatische Abbaubarkeit der CD ist mehrfach untersucht worden. Auf Grund nicht vorhandener reduzierender Molekülen sind sie gegen die stärkehydrolysierenden  $\beta$ -Amylasen grundsätzlich stabil<sup>17</sup>.  $\alpha$ -Amylasen, sogenannte Endoamylasen, die in der Lage sind, Saccharide in der Mitte zu spalten, hydrolysieren die CD in der Reihenfolge  $\gamma$ -,  $\beta$ -,  $\alpha$ -CD. Menschliche Speichelamylase baut  $\gamma$ -CD, nicht aber  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD ab<sup>18</sup>. Die anaerobe menschliche Darmflora kann CD abbauen<sup>19</sup> und somit auch die Verwertung nach oraler Applikation beeinflussen.

Neben der Größe unterscheiden sich die CD besonders in ihrer Wasserlöslichkeit, einer Eigenschaft, die für den Einsatz als Lösungsvermittler für schwer lösliche Arzneistoffe essentiell ist. Die Kavität des sehr gut wasserlöslichen  $\alpha$ -CD ist für eine Komplexbildung in der Regel zu klein. Das  $\beta$ -CD, welches von den räumlichen Ausmaßen gesehen am günstigsten zur Einlagerung von Pharmaka geeignet ist, besitzt mit allerdings 1,85% (m/V) eine Wasserlöslichkeit, die seinen therapeutische Nutzen als Lösungsvermittler unterläuft.

| Derivat           | Wasserlöslichkeit<br>(g/100ml) 25°C |
|-------------------|-------------------------------------|
| $\alpha$ -CD      | 14,2                                |
| $\beta$ -CD       | 1,85                                |
| $\gamma$ -CD      | 23,2                                |
| 2-HP- $\beta$ -CD | >50                                 |

**Tabelle 1** Wasserlöslichkeit ausgewählter CD-Derivate

### 1.2.3. Pharmakologische und toxikologische Eigenschaften der Cyclodextrine (CD)

Für die Zulassung eines Hilfsstoffes sind umfassende Kenntnisse über das Verhalten im Körper notwendig. In zahlreichen Veröffentlichungen liegen Daten sowohl über die natürlichen als auch die chemisch modifizierten CD vor.

Auf Grund des polaren Charakters werden die meisten CD nach peroraler Gabe aus dem Gastrointestinaltrakt nur gering resorbiert. Die Gallenflüssigkeit erhöht die Resorption der CD. Die Hauptmenge der oral applizierten CD wird durch die gastrointestinale Flora metabolisiert. Der Abbau findet dabei fast ausschließlich im Kolon statt. Daher findet man in den Faeces nur Spuren und im Urin etwa 1% unverändertes  $\beta$ -CD.

Nach intravenöser Gabe verschiedener, hydrophiler CD werden über 99,5% unverändert im Urin ausgeschieden. Die CD werden durch Enzyme des Magens und des Pankreas nicht abgebaut.

Nach peroraler Gabe von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD wurden keine signifikanten toxischen Effekte beobachtet. Lediglich  $\beta$ -CD führt bei langzeitiger Gabe (2,5% und 5% in der Nahrung) an Ratten zu makroskopischen Veränderungen in Leber und Nieren<sup>20</sup>. Diese Erscheinung blieb bei einer vergleichenden Studie an Hunden aus<sup>20</sup> und ist also abhängig von der Spezies. Allerdings wurde bei höheren Dosen (bis 20% in der Nahrung) eine leicht abführende Wirkung entdeckt<sup>21</sup>. Diese Nebenwirkung ist jedoch von nahezu allen schwer verdaulichen Kohlenhydraten bekannt.

| Derivat           | Applikation | LD <sub>50</sub> -Wert (Spezies) [g/kg] |
|-------------------|-------------|---|
| $\alpha$ -CD      | p.o.        | >12,5 (Ratte)                           |
| $\beta$ -CD       | p.o.        | >18,8 (Ratte)<br>5,0 (Hund)             |
| $\gamma$ -CD      | p.o.        | >16,0 (Maus)<br>> 8,0 (Ratte)           |
| $\alpha$ -CD      | i.v.        | 1,0 (Ratte)                             |
| $\beta$ -CD       | i.v.        | 0,79 (Ratte)                            |
| $\gamma$ -CD      | i.v.        | >2,4 (Ratte)<br>>4,0 (Maus)             |
| 2-HP- $\beta$ -CD | i.v.        | >4,0 (Ratte)<br>10,0 (Maus)             |

**Tabelle 2** LD<sub>50</sub>-Werte der Cyclodextrine bei verschiedenen Applikationsarten und Spezies<sup>22, 23, 24</sup>

Die Toxizität nach parenteraler Gabe ist abhängig von dem verwendeten CD und der Art der Applikation. So werden nach Verabreichung hoher Dosen der natürlichen CD irreversible nephrotoxische Schäden (glomeruläre Nekrosen) und Gewebeschädigungen beobachtet<sup>24</sup>. Eine Ursache ist dabei, bedingt durch die schlechte Wasserlöslichkeit besonders des  $\beta$ -CD, die Anreicherung und Rekristallisation in den proximalen Tubuli. Ähnliche Erscheinungen sind bei den definiert methylierten Derivaten zu beobachten, wohingegen diese Nebenwirkung bei den statistisch alkylierten CD nicht auftrat. In der Reihenfolge  $\beta$ -CD >  $\alpha$ -CD >  $\gamma$ -CD zeigen die Muttersubstanzen, sowie verschiedene CD-Derivate eine Erhöhung der Hämolyse humaner Erythrozyten in Folge von Membranzerstörung<sup>25</sup>. Ursachen dafür sind Komplexbildungen mit Bestandteilen der Zellmembranen in Abhängigkeit von der Größe der Kavität des CD. Im umgekehrten Fall sind CD jedoch in der Lage, die hämolytische Aktivität verschiedener Pharmaka durch die Bildung von Einschlussverbindungen zu verringern<sup>26, 27</sup>.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die akute Toxizität der natürlichen CD und des 2-HP- $\beta$ -CD nach p.o. und i.v. Applikation. Ein Vergleich der LD<sub>50</sub>-Werte der CD (Tabelle 2) mit den üblichen Mengen an CD (Tabelle 3), die mit Fertigarzneimitteln aufgenommen werden zeigt, dass die hierbei zugeführte Dosis weit unter der toxikologisch bedenklichen Konzentration liegt.

Teratogene oder mutagene Effekte sind bei keinem natürlichen oder chemisch modifizierten Cyclodextrin beobachtet worden.

| Handelsname<br>Applikationsweg | Cyclodextrin                      | CD-Dosis pro<br>Dosiereinheit | Dosis bezogen auf<br>70kg KG |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Brexidol®<br>p.o.              | $\beta$ -CD (Piroxicam)           | 171,2mg                       | 2,45mg/kg KG                 |
| Prostavasin®<br>i.v.           | $\alpha$ -CD (PG E <sub>1</sub> ) | 646,7 $\mu$ g                 | 9,24 $\mu$ g/kg KG           |

**Tabelle 3** Cyclodextrinhaltige Fertigarzneimittel mit Dosierung

#### 1.2.4. Anwendung der Cyclodextrine

Das Anwendungsspektrum der CD ist bedingt durch deren Fähigkeit zur Bildung von Einschlussverbindungen sehr breit und vielfältig. Sie finden unter anderem Einsatz als Lösungsvermittler, zur Stabilisierung empfindlicher oder flüchtiger Substanzen, zur Verbesserung ungünstiger organoleptischer Eigenschaften oder um die Absorption und Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zu erhöhen. Weiterhin kann durch Komplexierung von Wirkstoffen deren systemische Toxizität gemindert oder lokale Irritation vermieden werden.

Die Pharmaindustrie nutzt die genuinen CD und deren Derivate zur Formulierung von Fertigarzneimitteln. So kann z.B. durch den Einschluss hydrophober Wirkstoffe die Wasserlöslichkeit der Stoffe gesteigert werden. Man erreicht eine einfache, wenig toxische Zubereitung und häufig eine verbesserte Resorption. Zu beachten ist hierbei, dass es in Abhängigkeit von der Komplexstabilität zu einer verlangsamten Freigabe des Wirkstoffes kommen kann, was wiederum zu einer Verlängerung der Wirkdauer und weiterer Veränderungen des pharmakokinetischen Profils führt. Eine Vielzahl chemisch unterschiedlicher Arzneistoffe ist als Eingebettung in natürliche und modifizierte CD getestet worden (Tabelle 4). Die Erhöhung der Löslichkeit ist dabei zum Teil beträchtlich. Von besonderem pharmazeutischen Interesse ist hierbei die Solubilisierung von Insulin<sup>28</sup> und Steroidhormonen<sup>29</sup> sowie von antiviralen Wirkstoffen<sup>30</sup> für die nasale Applikation.

MÜLLER und BRAUNS patentierten die Einschlussverbindungen von in Wasser schwer löslichen oder instabilen Arzneistoffen in  $\beta$ -Cyclodextrinethern und  $\beta$ -Cyclodextrinestern<sup>31</sup>.

| Arzneistoff         | Wasserlöslichkeit<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Löslichkeit in Cyclodextrin ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                   |
|---------------------|---|--|-------------------|
|                     |   | $\beta$ -CD                                      | 2-HP- $\beta$ -CD |
| <b>Diazepam</b>     | 55,2                                      | 199  | 154               |
| <b>Digitoxin</b>    | 15,5                                      | 422  | 2330              |
| <b>Digoxin</b>      | 66,5                                      | 5970   | 3090              |
| <b>Indomethacin</b> | 22,9                                      | 56,6   | 39,7              |
| <b>Prednisolon</b>  | 145,0                                     | 3440   | 2210              |
| <b>Progesteron</b>  | 13,2                                      | 41,5   | 1160              |
| <b>Testosteron</b>  | 31,4                                      | 86,0   | 1580              |

**Tabelle 4** Löslichkeit verschiedener Arzneistoffe in Wasser,  $\beta$ -CD und 2-HP- $\beta$ -CD<sup>32</sup>

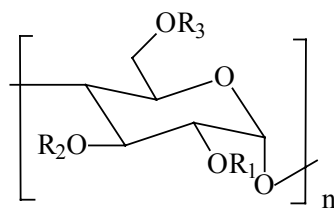
Die Kosmetik-, Pflege- und Duftstoffindustrie nutzen die CD, um störende Geruchsstoffe wie Mercaptane in Haarpflegemitteln zu maskieren. Andererseits wird durch die Bildung der Einschlussverbindungen der Dampfdruck erniedrigt, ein Effekt, der dazu genutzt wird, angenehme Aromen (z.B. Limonenöl) über lange Zeit freizusetzen.

Vitamine können durch den Einschluss in CD stabilisiert werden. Die Einschlussverbindungen bieten für sie Schutz vor Abbau durch Autoxidation, Photolyse oder Hydrolyse.

Nicht zuletzt finden CD als chirale Selektoren bei Racemattrennungen breite Anwendung. Bedingt durch ihren biologischen Ursprung stehen sie nur in der rechtsdrehenden Form zur Verfügung. Auf diesem Weg können Enantiomere voneinander getrennt werden. Die Entwicklung chromatographischer und elektrophoretischer Trennmethode ist allerdings ein noch nicht abgeschlossenes Forschungsgebiet.

### 1.2.5. Chemisch modifizierte Cyclodextrine

Die Derivatisierung der CD erfolgt aus unterschiedlichen Gründen. Durch Modifizierungen am Molekül werden beispielsweise die Löslichkeit und die Komplexbildung verändert. Das hat zur Folge, dass sich u.a. toxikologische Parameter zu günstigeren Bereichen hin verschieben (vgl. z.B.  $\beta$ -CD). Bisher sind mehr als Hundert unterschiedlich chemisch veränderter  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD dargestellt worden. Praktische Relevanz erreichten nur einige wenige CD, z.B. solche mit Hydroxypropyl-, Methyl- oder Sulfobutylethersubstituenten. Die Tabelle 5 gibt exemplarisch einige mögliche Modifikationen wieder.

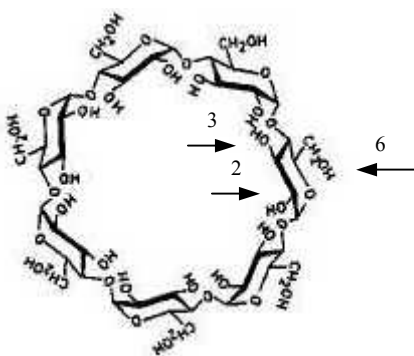


$n=6$   $\alpha$ -CD,  $n=7$   $\beta$ -CD,  $n=8$   $\gamma$ -CD

| Verbindung                       | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>                  | R <sub>3</sub>                   | Wasserlöslichkeit<br>[g/100ml] |
|----------------------------------|--|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Hydrophile Derivate              |  |                                 |                                  |                                |
| Methylierte Cyclodextrine        |  |                                 |                                  |                                |
| 3-Mono- <i>O</i> -methyl-CD      | H  | CH <sub>3</sub>                 | H                                |                                |
| 2,6-Di- <i>O</i> -methyl-CD      | CH <sub>3</sub>  | H                               | CH <sub>3</sub>                  | 57                             |
| 2,3,6-Tri- <i>O</i> -methyl-CD   | CH <sub>3</sub>  | CH <sub>3</sub>                 | CH <sub>3</sub>                  | 31                             |
| Hydroxyalkylierte Cyclodextrine  |  |                                 |                                  |                                |
| 2-Hydroxyethyl-CD                | R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = H oder CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH                 |                                 |                                  | >50                            |
| 2-Hydroxypropyl-CD               | R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = H oder CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>3</sub>                |                                 |                                  | >50                            |
| 3-Hydroxypropyl-CD               | R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = H oder CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH |                                 |                                  | >50                            |
| Verzweigte Cyclodextrine         |  |                                 |                                  |                                |
| 6- <i>O</i> -Glucosyl-CD         | H  | H                               | H oder Glucose                   |                                |
| 6- <i>O</i> -Maltosyl-CD         | H  | H                               | H oder Maltose                   |                                |
| 6- <i>O</i> -Dimaltosyl-CD       | H  | H                               | H oder (Maltose) <sub>2</sub>    |                                |
| Hydrophobe Derivate              |  |                                 |                                  |                                |
| Alkylierte Derivate              |  |                                 |                                  |                                |
| 2,6-Di- <i>O</i> -ethyl-CD       | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  | H                               | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>    |                                |
| 2,3,6,-Tri- <i>O</i> -ethyl-CD   | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>   | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>    |                                |
| Acylierte Derivate               |  |                                 |                                  |                                |
| 2,3-Di- <i>O</i> -hexanoyl-CD    | COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>   | H                               | COC <sub>5</sub> H <sub>11</sub> |                                |
| 2,3,6-Tri- <i>O</i> -acetyl-CD   | COCH <sub>3</sub>  | COCH <sub>3</sub>               | COCH <sub>3</sub>                |                                |
| 2,3,6-Tri- <i>O</i> -butanoyl-CD | COC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  | COC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | COC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  |                                |
| Ionisierbare Derivate            |  |                                 |                                  |                                |
| 6- <i>O</i> -Carboxymethyl-CD    | H  | H                               | H oder CH <sub>2</sub> COONa     |                                |
| Sulfatiertes CD                  | R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = H oder SO <sub>3</sub> Na                                 |                                 |                                  |                                |
| Sulfobutyliertes CD              | R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = H oder (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> Na |                                 |                                  |                                |

**Tabelle 5** Chemische Struktur ausgewählter Cyclodextrin-Derivate

Die CD besitzen eine Vielzahl von OH-Gruppen. So enthält  $\beta$ -CD, das gebräuchlichste CD, 21 Hydroxylgruppen, wovon 7 primären und 14 sekundären Charakter haben. Es ist generell möglich, dass alle verfügbaren OH-Gruppen durch Derivatisierungsreagenzien substituiert werden. Regioselektive Modifizierungen sind schwierig, lassen Selektivität vermissen und verlaufen mit niedrigen Ausbeuten. Durch Ausnutzung der unterschiedlichen Reaktivität der einzelnen Hydroxylgruppen einerseits und ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von definiert orientierten Einlagerungskomplexen andererseits können mit einigen Reagenzien vereinzelt weitgehend regioselektiv substituierte Produkte erhalten werden<sup>33</sup>.



**Abbildung 6** Struktur von  $\beta$ -CD mit 2-, 3- und 6-Hydroxylgruppe der Glucopyranoseeinheit

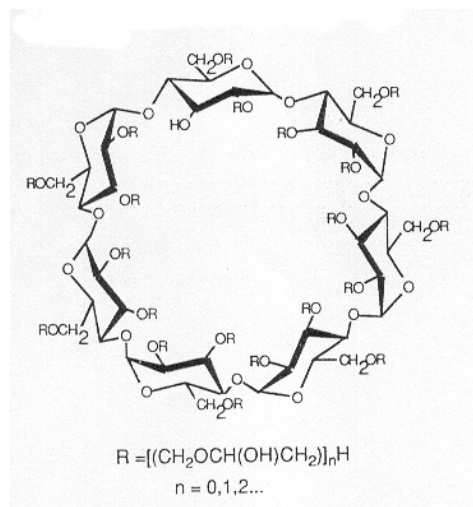
Die Hydroxylgruppen der CD besitzen nukleophilen Charakter. Daher ist der elektrophile Angriff auf die OH-Gruppen die bestimmende Reaktion für die Regioselektivität und das Ausmaß des Substitutionsgrades. Die primären OH-Gruppen der Position 6 haben die größte Basizität, meistens auch die größte Nukleophilie und sind zudem am leichtesten für Derivatisierungen zugänglich. Sie bilden demzufolge die bevorzugte Stelle für Derivatisierungsreaktionen unter schwach basischen Bedingungen. Es folgen die reaktivere sekundäre Hydroxygruppe der Position 2 und dann die Position 3. Gründe für die Reaktivitätsunterschiede sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen der Positionen 2 und 3 und die damit verbundene Stabilisierung des Oxoniumions, sowie der negative induktive Effekt des benachbarten Ringsauerstoffs<sup>34</sup>. Es gibt in der Literatur<sup>35, 36, 37</sup> verschiedene Strategien, selektiv substituierte Derivate zu synthetisieren, u.a. durch gezielten Schutz der Hydroxylgruppen. Allen ist gemeinsam, dass auf Grund der Empfindlichkeit der glycosidischen Bindung gegenüber Säuren im alkalischen bis leicht sauren Milieu gearbeitet werden muss.

Neben den Umsetzungen mit Derivatisierungsreagenzien können die CD durch Oxidation an primären Alkoholfunktion zu Carboxylverbindungen oder unter Spaltung einer C-C-Bindung zu Makro-Kronenethern modifiziert werden<sup>38</sup>.

#### 1.2.6. 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin

2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (2-HP- $\beta$ -CD) ist ein monofunktionalisiertes CD-Derivat, d.h. ein durch gezielten Einbau eines Substituenten an eine oder mehrere der möglichen Positionen der Glucoseeinheiten erhaltenes Produkt. Es wird durch den Umsatz von  $\beta$ -CD mit Propylenoxid<sup>53</sup> unter Variation der Mengen der Reaktionspartner und des pH-Wertes

dargestellt. Je nach den Reaktionsbedingungen erhält man verschieden substituierte Produkte, die sich in Grad und Ort der Substituenten unterscheiden (Abbildung 7).



**Abbildung 7** Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin

Eine exakte Synthesesteuerung zur Gewinnung eines definierten Substitutionsmusters ist bisher nicht möglich. Die Menge an eingesetztem Propylenoxid limitiert die Anzahl einführbarer Substituenten. Man charakterisiert mittels NMR oder ES-MS die entstandenen 2-HP- $\beta$ -CD wie folgt:

- Molarer Substitutionsgrad (MS):      Anzahl von Substituenten pro Glucoseinheit
- Substitutionsgrad (DS):              Anzahl der Substituenten am Gesamtmolekül

Die chemische Struktur der Hydroxyalkylreste erlaubt sogar eine Mehrfachsubstitution am eingeführten Alkylrest. Der MS (s.o.) kann demzufolge größer als 3 sein. Bei der Synthese werden gering substituierte 2-HP- $\beta$ -CD angestrebt, da es sich gezeigt hat, dass höher substituierte Derivate eine erhöhte Toxizität zur Folge haben<sup>39</sup>.

Hydroxyalkylierte Cyclodextrine sind farblose Feststoffe von amorphem Charakter, besitzen praktisch unbegrenzte Wasserlöslichkeit und sind wenig hygroskopisch sowie kaum oberflächenaktiv. Pharmakologische und toxikologische Parameter zeigen, dass es sich hierbei um einen gut untersuchten und charakterisierten Hilfsstoff handelt, der sich durch eine geringe LD<sub>50</sub>, sowie durch fehlende Mutagenität, Kanzerogenität, Teratogenität oder fehlendes anderes embryotoxisches Potential auszeichnet.



## 2. Problemstellung

Fomocain (4-[3-(4-Phenoxymethylphenyl)-propyl]-morpholin) ist ein von OELSCHLÄGER im Jahr 1957 synthetisiertes, seit 1967 im Handel befindliches Lokalanästhetikum. Es wird für die Therapie von Dermatosen genutzt und bisher in Form von Salben und Gelen angewendet. Die Aufnahme in den Deutschen Arzneimittel-Codex (DAC) erfolgte 1979. Seit 1991 ist auch das Hydrochlorid monographiert. Die Substanz, die als Etherderivat in der Gruppe der LA eine neue chemische Struktur aufweist, wirkt im Gegensatz zu Lokalanästhetika vom Ester- und Amidtyp nicht sensibilisierend und ist wesentlich weniger toxisch.

Auf Grund der physiko-chemischen Eigenschaften des Fomocain existiert bisher keine parenterale Zubereitung. Das an sich stabile Hydrochlorid ist nur zu etwa 5% wasserlöslich, diese Lösung zeigt einen pH-Wert von 3,4 und reizt das Gewebe.

Primäre Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation war daher die Herstellung einer s.c.- oder i.m.-applikationsfähigen Fomocain-Formulierung. Es sollten neue Salze dargestellt und auf ihr Löslichkeitsverhalten untersucht werden. Ferner sollte die Möglichkeit der Bildung von Mischmizellen geprüft und die Anwendung von Lösungsvermittlern untersucht werden. Als weitere Alternative galt die Einbettung der Substanz in einen geeigneten, pharmakologisch-toxikologisch unbedenklichen Hilfsstoff. Ausgehend von der Stammsubstanz Fomocain sind weitere Analoga durch Kettenverlängerung und Variation der Aminkomponente dargestellt worden, um ggf. die Wasserlöslichkeit ihrer Salze zu verbessern und dadurch den Zusatz von weiteren Hilfsstoffen entbehrlich zu machen.

Neben der Findung einer neuen geeigneten Zubereitung und der pharmakologischen Prüfung der neuen Verbindungen sollten auch die physiko-chemischen Eigenschaften, z.B.  $pK_a$ -Wert,  $lgP$ -Wert usw. ermittelt werden. Gegen Humanserum sollte im Ultrazentrifugationsversuch die Frage der Bindung an die Plasmaproteine geklärt werden. Inkubationsversuche in Rinderleberhomogenisaten waren vorgesehen, um erste Informationen über die Metabolisierung der neuen Fomocainderivate zu erhalten.

Gegebenenfalls sollte die neue Fomocainformulierung sowie die Eignung der neuen Fomocainderivate hinsichtlich ihres zukünftigen Einsatzes für die medikamentöse Therapie genauer studiert werden. Das betraf besonders die Fragen nach der maximal möglichen Konzentration an Wirkstoff, Stabilität und Autoklavierbarkeit der Lösung, die Prüfung der Mizellisierungstendenz und die Charakterisierung des pharmakologisch-toxikologischen Verhaltens.

### 3.1. Fomocain in einer parenteralen Zubereitung

#### 3.1.1. Löslichkeitserhöhung

Mit einer Löslichkeit von  $8,7\mu\text{g/ml}$  ( $0,028\text{mmol/l}$ ) ist Fomocain in Wasser praktisch unlöslich. Das Hydrochlorid ist in Aqua dest. (pH 5,00) zwar leicht löslich, jedoch kristallisiert die Base aus derzeit unbekannten Gründen beim längeren Lagern der Lösung aus. Eine pH-Wert Anpassung auf den physiologischen pH von 7,40 ist auf Grund des niedrigen Trübungs-pH-Wertes von 5,70 nicht möglich. Die Base wird also vollständig ausgefällt. Tierversuche haben gezeigt, dass bei der Injektion einer Lösung von Fomocain-HCl in Rattenextremitäten die Base im Gewebe auskristallisiert<sup>61</sup> und dabei zu Reizungen und Nekrosen führt, da der Abtransport des Pharmakons nicht gewährleistet ist. Für eine parenterale Zubereitung war es demnach notwendig, ein Milieu zu finden, in dem dieser Prozess zurückgedrängt wird. In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Möglichkeiten dazu geprüft.

##### Löslichkeitserhöhung durch Salzbildung

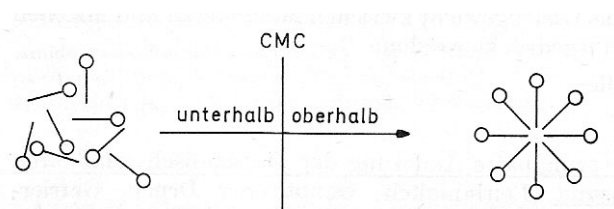
Die Bildung wasserlöslicher Salze ist eine bewährte Methode, um schwer lösliche Arzneistoffe in wässrigen Zubereitungen zur Verfügung zu stellen. Durch die Prüfung verschiedener Säuren sollte für die Base Fomocain ein Gegenion gefunden werden, dessen chemische Eigenschaften zu einem Salz führen, aus dem die Base verzögert bzw. überhaupt nicht auskristallisiert. Neben anorganischen und organischen Säuren wurden auch Aminosäuren geprüft.

Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs im Morpholin-Ring des Fomocain ist für die Protonierungsreaktion der Elektronendonator. Da die geprüften Säuren (Tabelle 23, Seite 61) zum Teil mehrere Säurefunktionen trugen, wurden sie in Abhängigkeit von der Protonenzahl in äquimolarer, halb-molarer oder drittel-molarer Konzentration zum Fomocain eingesetzt. Weder die anorganischen noch die organischen Säuren konnten zu einer Verbesserung der Fomocainlöslichkeit beitragen. Die erhaltenen Lösungen waren häufig stark sauer und gefärbt, und die Base kristallisierte bei Lagerung allmählich an der Gefäßwand aus. L-Asparaginsäure, zugesetzt in äquimolarer Konzentration, erhöhte die Konzentration an Fomocain bei einem pH-Wert von 7,03 um den Faktor 4,7 auf  $41,21\mu\text{g/ml}$  ( $0,132\text{mmol/l}$ ). Allgemein war bei allen verwendeten Aminosäuren eine deutlichere Löslichkeitsverbesserung zu verzeichnen als in den vorangegangenen Versuchen mit anorganischen und organischen Säuren. Da aber das angestrebte Ziel einer

möglichst hohen Fomocain-Konzentration unter physiologischen Bedingungen nicht erreicht werden konnte, wurden diese Arbeiten abgebrochen.

#### Löslichkeitserhöhung durch die Bildung von Mischmizellen

Mizellen sind Molekülaggregate, die sich ab einer bestimmten Konzentration, der sog. kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC), und nur in einer Lösung bilden. Charakteristische Mizellbildner sind Substanzen mit grenzflächenaktiven Eigenschaften z.B. Tenside. Die Mizellbildung verläuft unter Entropiezunahme und ist dadurch gekennzeichnet, dass das System einen Gleichgewichtszustand erreicht und thermodynamisch stabil ist.



**Abbildung 8** Tensidmoleküle und Mizellbildung (schematisch)

Fomocain hat bedingt durch seine lipophilen und hydrophilen Strukturbausteine amphiphilen Charakter. Die CMC ist mit 0,82g/100ml beschrieben<sup>40</sup> und wurde von mir neu mit 0,6008g/100ml bestimmt. Das Lokalanästhetikum ist also in der Lage, Mizellen zu bilden. Für das ebenfalls schlecht wasserlösliche Analgetikum Ibuprofen (0,47mg/ml) sind ältere technologische Versuche bekannt<sup>41</sup>, bei denen aus Ibuprofen und einem Ibuprofen-Salz Mischmizellen erzeugt werden und somit hohe Konzentrationen an Arzneistoff im wässrigen Milieu erreicht werden können. Durch verschiedene Strategien wurden dies mit Fomocain-Base und Fomocain-HCl Mischmizellen angestrebt.

1. Die angefertigten Feststoffverreibungen in den Verhältnissen 1:1, 1:2 und 2:1 von Base zu Hydrochlorid sollten in Isotonischer NaCl-Lösung, Ringer-Lösung oder Aqua dest. zu 2% (m/V) berechnet auf Fomocain gelöst werden.

Alle Ansätze führten zu keinem Erfolg. Neben deutlich abgesetzten Niederschlägen opaleszierten die Lösungen. Im filtrierten Überstand der neutral eingestellten Lösungen war durch HPLC-Gehaltsbestimmung DAC (2.2.29) kein Fomocain nachweisbar, die Base war also vollständig auskristallisiert.

2. Die angefertigte Feststoffverreibung im Verhältnis 1:1 von Base zu Hydrochlorid wurde in einem organischen Lösungsmittel gelöst und aus diesem neu auskristallisiert. Diesem Vorgehen lag der Gedanke zu Grunde, dass unter Umständen neue

Kristallmodifikationen entstehen, die sich durch eine bessere Löslichkeit auszeichnen. Als organische Solventien kamen Aceton, Acetonitril, Methanol und THF zum Einsatz. Das anschließende Lösen in einem wässrigen Lösungsmittel (Isotonische NaCl-Lösung, Ringer-Lösung, Aqua dest.) erfolgte zu 2% (m/V) berechnet auf Fomocain. Diese Versuche waren ebenfalls erfolglos. Alle Proben enthielten bei physiologischem pH-Wert nach der Filtration keine Base.

3. Zu einer wässrigen Stammlösung von Fomocain-HCl (2,88mM) in Isotonischer NaCl-Lösung wurde eine Stammlösung von Fomocain in Aceton (500mM) in verschiedenen Mengen gegeben. Angestrebt wurde eine Endkonzentration von 2% Fomocain-Base. Schon bei sehr geringer Konzentration an zugegebener Base erfolgte eine Auskristallisation, die sich auch durch Behandlung im Ultraschallbad oder durch Erwärmen nicht beseitigen ließ.

#### Löslichkeitserhöhung durch die Verwendung von Lösungsvermittlern

Lösungsvermittler sind Hilfsstoffe, mit denen die Löslichkeit von Arzneistoffen deutlich verbessert werden kann. Voraussetzung für die Anwendung ist die pharmakologische Unbedenklichkeit. Ebenso dürfen keine Inkompatibilitäten mit dem Arzneistoff auftreten. Die als Lösungsvermittler verwendeten Stoffe sind solche mit stark ausgeprägten hydrophilen polaren Gruppen im Molekül. Bevorzugt werden stark hydroxylhaltige Substanzen wie z.B. ein- und mehrwertige Alkohole, eingesetzt. Die Lösungsvermittlung wird auf die Bildung von Wasserstoffbrücken oder auf Komplexbildung bzw. auf das Herabsetzen der Oberflächenspannung (z.B. durch Mizellbildung) zurückgeführt. Durch Veränderung der Struktur des Wassers kann ebenfalls Einfluss auf die Löslichkeit genommen werden. Die sog. Wasserstrukturbrecher (z.B. Nicotinamid) ersetzen dabei die Wasserstoffbrücken im Wassermolekül durch andere, entsprechende Bindungen.

| Lösungsvermittler                               | Anwendungsbeispiele |
|---|---------------------|
| <b>ein- und mehrwertige Alkohole</b>            | Digitalisglycoside  |
| Ethanol, Isopropanol                            |                     |
| 1,2-Propylenglycol, Glycerol                    |                     |
| <b>Ether</b>                                    | Chloramphenicol     |
| Glycolether, Polyethylenglycole                 |                     |
| <b>Amide und stickstoffhaltige Verbindungen</b> | Riboflavin          |
| Ethylendiamin, Diethanolamin                    |                     |
| Acetamid, Dimethylacetamid                      |                     |

**Tabelle 6** Lösungsvermittler mit erfolgreichen Anwendungsbeispielen

Die o.g. verschiedenen Wirkungsmechanismen lassen auch fließende Übergänge vermuten. Daher kann kein starres Schema der Lösungsvermittlung vorgestellt werden.

In Rahmen der vorliegenden Dissertation kamen die in Tabelle 7 aufgeführten Lösungsvermittler in verschiedenen Konzentrationen zur Erprobung. Der Einsatz richtete

| Lösungsvermittler       | Verwendete Konzentrationen   |
|-------------------------|------------------------------|
| Mannitol                | 4,5% (m/V)                   |
| Sorbitol                | 4,5% (m/V)                   |
| Inositol                | 4,5% (m/V)                   |
| Nicotinamid             | 0,12%, 1,22% (m/V)           |
| Glycerol                | 35%, 80% (m/V)               |
| Propylenglycol          | 2,5%, 35%, 80% (m/V)         |
| Ethanolamin             | 0,6%, 1,2% (m/V)             |
| Dimethylisosorbid (DMI) | 5%, 10%, 20%, 30%, 40% (V/V) |

**Tabelle 7** Verwendete Lösungsvermittler mit Konzentrationen

sich nach pharmakologisch-toxikologischen Gesichtspunkten. So wurden die Maximalkonzentrationen auf Grund von adi-Werte (acceptable daily intake), WHO-Angaben und LD<sub>50</sub>-Werten ermittelt bzw. Rezepturen mit o.g. Lösungsvermittlern aus der Literatur entnommen und gegebenenfalls modifiziert.

Unabhängig von der Art und der Konzentration des Lösungsvermittlers erfolgte die Bearbeitung der Proben immer nach dem gleichen Schema. Ziel war die Zubereitung einer pH-neutralen Fomocain-Lösung mit einem Gehalt von 2% (m/V) Fomocain, berechnet auf die Base. Als Lösungsmittel dienten jeweils Ringer-Lösung (pH 7,27), Isotonischer NaCl-Lösung (pH 7,10) und Phosphat-Puffer EuAB (pH 7,25) mit und ohne Magnesiumhydrogenaspartat als Pufferzusatz. Nach ggf. pH-Einstellung, 24 h Rühren und Filtration der Probe über 0,2µm Filter wurde der Gehalt nach DAC mittels HPLC bestimmt.

In dieser Versuchsreihe gelangen die ersten nennenswerten Konzentrationssteigerungen: mit Ethanolamin (1,2% m/V) 470µg/ml = 1,51mmol/l = 0,047% m/V Fomocain (pH 7,23), Propylenglycol (80% m/V) 660,71µg/ml = 2,12mmol/l = 0,066% m/V Fomocain (pH 7,00) und Dimethylisosorbid (40% V/V) 5,98mg/ml = 19,2mmol/l = 0,60% m/V Fomocain (pH 7,32). Im Vergleich zur maximalen Wasserlöslichkeit der Fomocain-Base von 8,7µg/ml (0,028mmol/l) entspricht dies z.B. für DMI einer Steigerung um den Faktor 700. In Tabelle 8 sind die maximal erreichten Fomocain-Konzentrationen zusammengefasst, die mit verschiedenen Lösungsvermittlern in unterschiedlichen Konzentrationen und Lösungsmitteln erreicht wurden. Ethanol, als viel verwendeter Lösungsvermittler, wurde nicht in die Untersuchungen einbezogen, weil selbst Alkoholkonzentrationen > 50% (V/V)

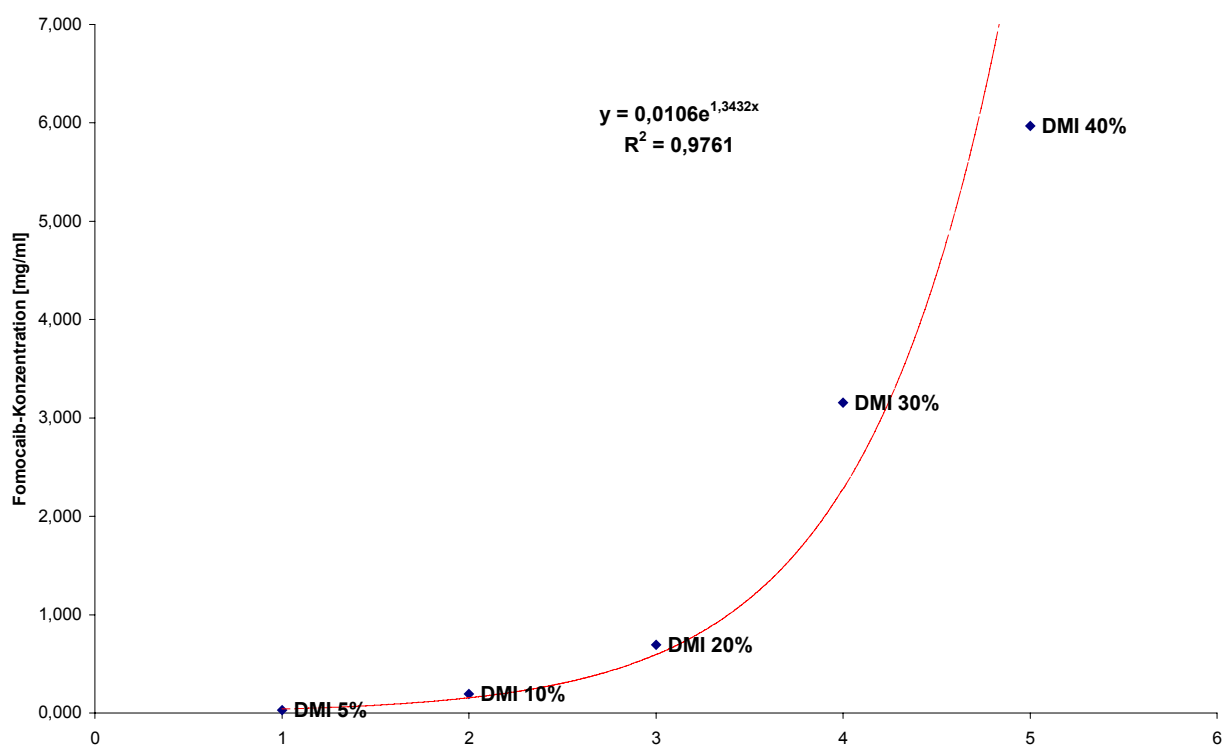
nicht ausreichen, um die Ausfällung der Base bei neutralem pH-Wert zu verhindern. Außerdem wurde auf Grund des bedenklichen toxikologischen Potentials auf eine genauere Testung verzichtet.

| Lösungsvermittler   | ohne Mg-hydrogenaspartat |                   |                           | mit Mg-hydrogenaspartat |                   |            |
|---------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|------------|
|                     | Ringer-Lösung            | Isoton. NaCl-Lsg. | Phosphat-Puffer (pH 7,25) | Ringer-Lösung           | Isoton. NaCl-Lsg. | Aqua dest. |
| Inositol 4,5%       | 0,063                    | <b>0,111</b>      | 0,017                     | 0                       | 0,020             | 0,025      |
| Mannitol 4,5%       | <b>0,102</b>             | 0,061             | 0                         | 0,034                   | 0,026             | 0          |
| Sorbitol 4,5%       | 0,016                    | 0,038             | 0                         | 0,037                   | 0,032             | 0          |
| Nicotinamid 0,12%   | 0,030                    | 0,013             | 0                         | 0,013                   | 0,033             | 0,045      |
| Nicotinamid 1,22%   | 0                        | 0                 | 0                         | 0                       | 0                 | 0          |
| Glycerol 35%        | 0,066                    | 0,064             | 0,015                     | <b>0,112</b>            | 0,099             | 0,048      |
| Glycerol 80%        | 0,082                    | 0,063             | 0,038                     | -                       | -                 | -          |
| Propylenglycol 2,5% | 0,002                    | 0,001             | 0,002                     | -                       | -                 | -          |
| Propylenglycol 35%  | 0,295                    | 0,253             | 0,091                     | <b>0,453</b>            | 0,328             | 0,097      |
| Propylenglycol 80%  | 0,521                    | <b>0,661</b>      | 0,089                     | -                       | -                 | -          |
| Ethanolamin 0,6%    | 0,040                    | 0                 | 0                         | 0,425                   | 0,366             | 0,045      |
| Ethanolamin 1,2%    | 0,040                    | 0,02              | 0,002                     | <b>0,484</b>            | 0,396             | 0,052      |
| DMI 5%              | 0,029                    | -                 | -                         | -                       | -                 | -          |
| DMI 10%             | 0,197                    | -                 | -                         | -                       | -                 | -          |
| DMI 20%             | 0,694                    | -                 | -                         | -                       | -                 | -          |
| DMI 30%             | 3,163                    | -                 | -                         | -                       | -                 | -          |
| DMI 40%             | <b>5,989</b>             | -                 | -                         | -                       | -                 | -          |

**Tabelle 8** Maximale Fomocain-Konzentrationen (in mg/ml) mit diversen Lösungsvermittlern bei neutralem pH-Wert

Beim Vergleich der Daten untereinander und miteinander fällt auf, dass die Variation des Lösungsmittels zu keinen nennenswerten Konzentrationssteigerungen an Fomocain führt. Negative Auswirkungen hat lediglich der verwendete Phosphat Puffer EuAB auf die Löslichkeit. Die zusätzliche Pufferung des Systems durch Mg-hydrogenaspartat<sup>42</sup> bewirkt beim stark basischen Ethanolamin eine Verbesserung der lösungsvermittelnden Eigenschaften. Durch die Verwendung dieses Mg-Salzes wird auch der günstige Einfluss von Glycerol und Propylenglycol verstärkt. Die Zubereitungen der beiden vicinalen Alkohole zeigten leider eine extrem hohe Viskosität (dynamische Viskosität = 3,47mPas für 35% m/V Propylenglycol in Wasser). Mit Tavor<sup>®</sup>-Ampullen (Wirkstoff Lorazepam) existiert ein zugelassenes Fertigarzneimittel, das 80% m/V Propylenglycol enthält. Die toxischen Eigenschaften des Propylenglycols, das häufig als Ersatz von Ethanol dient, werden in zahlreichen Veröffentlichungen<sup>43, 44, 45, 46</sup> behandelt. Dabei reichen die Nebenwirkungen von Schmerzen bei der Injektion bis hin zur Hämolyse. Trotz der verbesserten Löslichkeit des Fomocain, die mit Propylenglycol erreicht werden konnte, wurde aus diesen Gründen auf eine detaillierte Prüfung der Zubereitung verzichtet.

Mit Dimethylisosorbid (Isosorbiddimethylether, DMI), dem methylierten Ether des Sorbitol, wurde die deutlichste Erhöhung der Löslichkeit von Fomocain erreicht. Mit steigender DMI-Konzentrationen stieg der Gehalt von Fomocain. Die Abhängigkeit



**Abbildung 9** Abhängigkeit der Fomocain-Konzentration von der Menge Lösungsvermittler DMI

zwischen der Konzentration des Lösungsvermittlers zur erreichbaren Fomocain-Konzentration spiegelt eine annähernd exponentielle Funktion (Abbildung 9) wieder. Maximal erreicht wurden  $5,989\text{mg/ml} = 19,2\text{mmol/l} = 0,60\%$  (m/V) Fomocain bei pH 7,38. Alle Lösungen waren klar, von intensiv gelber Farbe und aromatischem DMI-Geruch. Die Rückstellmuster wurden unter Lichtschutz bei Raumtemperatur 100 d gelagert. Es trat keine Auskristallisation der Base wohl aber eine merkliche Farbintensivierung ein.

Mit dem Lösungsvermittler DMI (40%) konnte also eine Fomocain-Zubereitung von 0,6% Base erreicht werden. Durch den Einsatz anderer Substanzen mit löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften konnten ebenfalls Konzentrationssteigerungen von Fomocain bewirkt werden. Die Zubereitungen waren alle einfach zusammengesetzt, bewegten sich im jeweils nebenwirkungsarmen Bereich des Hilfsstoffs und zeigten einen neutralen pH-Wert. Allerdings wurde das angestrebte Ziel einer 2%igen Lösung von Fomocain leider nicht erreicht.

### 3.1.2. Bildung einer Einschlussverbindung (EV)

Eine EV ist definitionsgemäß eine Molekülverbindung, bei der kleinere Moleküle in Hohlräume von größeren eingelagert sind. Van-der-Waals-Kräfte oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen halten dabei u.a. die Partner zusammen. Man unterscheidet nach der Geometrie der Hohlräume Kanaleinschluss-, Schichteneinschluss- und Käfigeinschlussverbindungen (Clathrate).

Die Suche nach geeigneten Molekülen mit ausreichend großem Hohlraum zur Einlagerung des Fomocain führte zu den Cyclodextrinen (CD), die Kanaleinschlussverbindungen bilden. Eine Vielzahl von Veröffentlichungen zeigt deren enormes Potenzial zur Löslichkeitsverbesserung<sup>u.a.32</sup> von Substanzen in der Pharmazie, Analytik oder der Kosmetikindustrie. Bisher sind jedoch nur wenige cyclodextrinhaltige Fertigarzneimittel zugelassen.

#### EV mit nativen Cyclodextrinen

Die nativen CD,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD unterscheiden sich besonders in der Größe ihrer Kavität und in der Wasserlöslichkeit. Dabei besitzt  $\beta$ -CD bei schlechter eigener Wasserlöslichkeit den für Xenobiotika günstigsten Hohlraum.

In Vorversuchen sollte zunächst geklärt werden, ob eines der nativen CD in der Lage ist, die Löslichkeit der Fomocain-Base unter Bildung einer EV zu verbessern. Es standen alle drei CD zur Verfügung. Auf Grund der guten Wasserlöslichkeit und seiner großen Kavität wurde  $\gamma$ -CD zuerst getestet. Dabei wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Konzentrationen an  $\gamma$ -CD verwendet. Als Lösungsmittel diente Ringer-Lösung pH 7,40. Die Gehaltsbestimmung erfolgte nach 24 h Rühren und Filtration über 0,2 $\mu$ m mit Hilfe der HPLC nach DAC.

|   | Eingesetzte $\gamma$ -CD Konzentration |                 |                  |
|---|--|-----------------|------------------|
|   | 5%                                     | 10%             | 15%              |
| <b>Erreichte Fomocain-Konzentration</b> | 4,96 $\mu$ g/ml                        | 5,89 $\mu$ g/ml | 13,10 $\mu$ g/ml |

**Tabelle 9** Maximale Fomocain-Konzentration in EV mit  $\gamma$ -CD

Die erreichten Fomocain-Konzentrationen lagen deutlich unter den maximal mit Lösungsvermittlern erreichten Ergebnissen, die bei ca. 6mg/ml lagen.

Die parallel durchgeführte, positive Testung mit dem merklich besser wasserlöslichen Derivat 2-HP- $\beta$ -CD schloss weitere Prüfungen mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD aus.



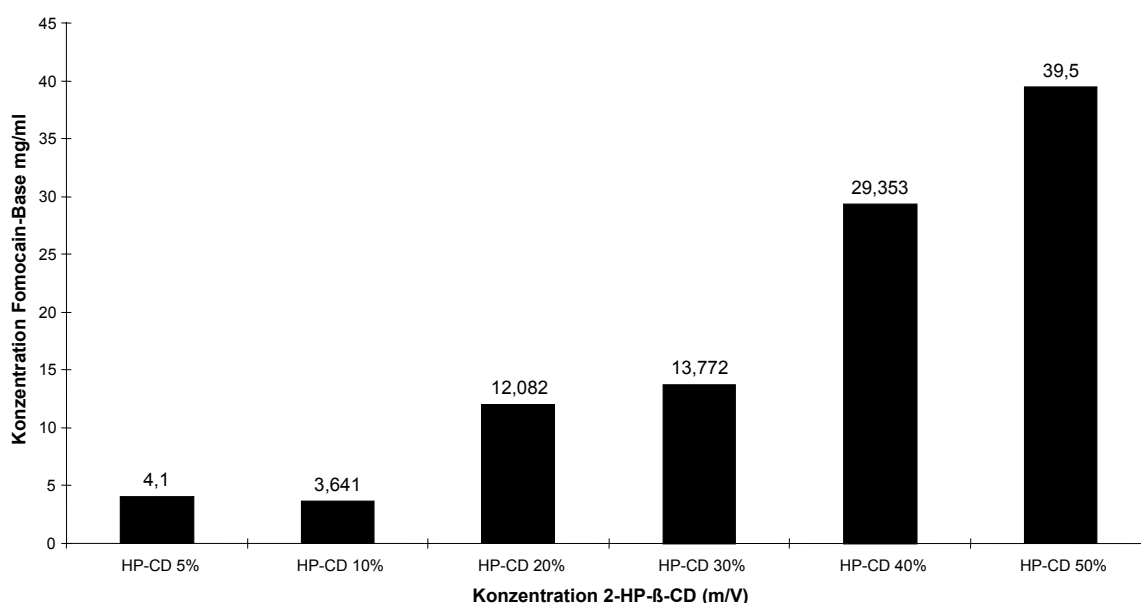
### EV mit 2-HP- $\beta$ -CD

2-HP- $\beta$ -CD ist das hydroxypropylierte Derivat von  $\beta$ -CD. Bei gleicher Größe der Kavität wie die native Substanz (0,78nm) ist dieses alkylierte CD mit >50g/100ml wesentlich besser wasserlöslich und daher als einschlussbildende Verbindung zu bevorzugen. Weiterhin ist 2-HP- $\beta$ -CD durch eine sehr geringe Toxizität (siehe 1.2.6., Seite 16) gekennzeichnet.

Zunächst wurde in dieser Versuchsreihe getestet, ob 2-HP- $\beta$ -CD in der Lage ist, bei physiologischem pH-Wert das Fomocain in hoher Konzentration einzuschließen.

Nachdem die vorangegangenen Versuche gezeigt hatten, dass die eingeführten Salzlösungen, wie Isoton. NaCl, keinen nennenswerten Beitrag zur Verbesserung der Löslichkeit leisten, wurde ausschließlich Ringer-Lösung verwendet. Dies hatte auch praktische Gründe, da die Zubereitung aus Ringer-Tabletten einfach und reproduzierbar war. Aus 2-HP- $\beta$ -CD wurde eine Konzentrationsreihe von 5%, 10%, 20%, 30%, 40% und 50% (m/V) hergestellt, ihr pH-Wert mit 0,1N-NaOH auf 7,25 - 7,40 eingestellt und diese Lösungen würden nach Zugabe des LA, 24 h Rühren bei RT, pH-Wert Einstellung und Filtration (0,2 $\mu$ m) mittels HPLC auf den Gehalt an Fomocain untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 zusammengefasst. Mit steigender Konzentration an 2-HP- $\beta$ -CD lässt sich deutlich mehr Fomocain in Lösung bringen. Die Grenze der Konzentration liegt bei  $\approx$  40,0mg/ml und lässt sich nicht steigern. Auch durch Erwärmen konnte nicht mehr Base in Lösung gebracht werden.



**Abbildung 10** Maximale Löslichkeit von Fomocain in Abhängigkeit von der 2-HP- $\beta$ -CD Konzentration

Die Konzentrationssteigerung von Fomocain mit zunehmender Menge 2-HP- $\beta$ -CD verlief nicht linear sondern zeigte exponentielles Verhalten. Um möglichst viel LA in Lösung zu bringen und auch zu halten, war demzufolge eine Lösung von 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD notwendig. In weiteren Versuchen galt es zu klären, ob durch spezifische Zusätze eine Erhöhung der Fomocain-Konzentration zu erreichen war. Außerdem sollte die optimale Zubereitung in der quantitativen Zusammensetzung geklärt und in ihrer Stabilität und ihrem Verhalten geprüft werden.

#### Einfluss des Substitutionsgrades von 2-HP- $\beta$ -CD auf die Löslichkeit

Die Substitution der im  $\beta$ -CD vorhandenen Hydroxylgruppen mit 1,2-Propylenoxid führt zu 2-HP- $\beta$ -CD. Durch Variation der Reaktionsbedingungen erhält man Derivate mit unterschiedlichem Substitutionsmuster und Substituentenzahl. Die entstehenden Produkte sind stets Gemische. Mit Hilfe von ESI-MS kann der Substitutionsgrad (DS) definiert werden. Je geringer die Zahl der eingeführten Substituenten ist, desto günstiger ist der Einfluss auf die Löslichkeitserhöhung durch Bildung einer Einschlussverbindung und umso geringer die Toxizität<sup>u.a.39, 53</sup>.

Für die Untersuchung des Einflusses des Substitutionsgrades von 2-HP- $\beta$ -CD auf die Löslichkeit von Fomocain wurden drei verschieden substituierte Derivate synthetisiert. Mit DS 4,75, DS 5,30 und DS 7,68 entstanden Produkte, die sich deutlich in der Substituentenzahl unterschieden. In Analogie zur Durchführung der vorangegangenen Versuche wurde eine Konzentrationsreihe (20%, 30%, 40%, 50% m/V) jeder Substanz in Ringer-Lösung hergestellt und Fomocain zugewogen. Nach Rühren, Einstellung des pH-Wertes und der Filtration erfolgte eine Gehaltsbestimmung für Fomocain nach DAC.

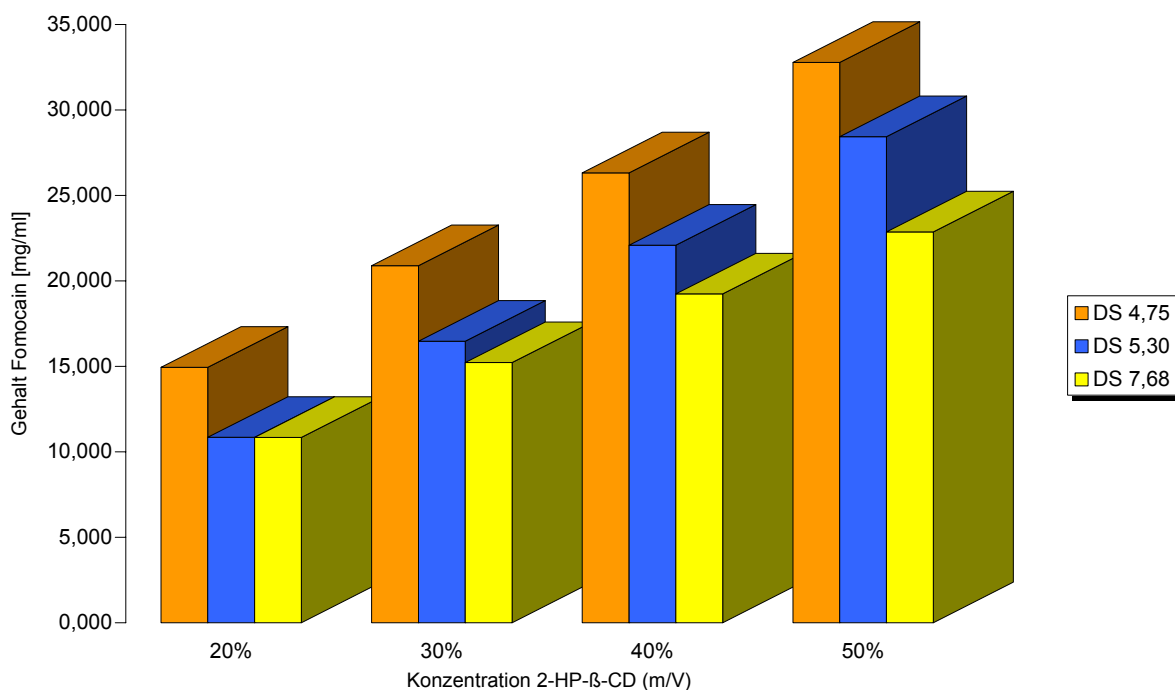
In Tabelle 10 sind die erreichten Fomocain-Konzentrationen in verschiedenen substituierten 2-HP- $\beta$ -CD bei unterschiedlichen Konzentrationen an CD gegenübergestellt. Es konnte

|                | 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (m/V) |        |        |        |
|----------------|--|--------|--------|--------|
|                | 20%  | 30%    | 40%    | 50%    |
| <b>DS 4,75</b> | 14,944                                       | 20,889 | 26,321 | 32,780 |
| <b>DS 5,30</b> | 10,848                                       | 16,475 | 22,090 | 28,435 |
| <b>DS 7,68</b> | 10,844                                       | 15,220 | 19,237 | 22,866 |

**Tabelle 10** Fomocain-Konzentration [mg/ml] in 2-HP- $\beta$ -CD verschiedener Substitutionsgrade

dabei gezeigt werden, dass 2-HP- $\beta$ -CD mit dem DS 4,75 über den gesamten Konzentrationsbereich das beste Lösungsvermögen für Fomocain besitzt. Eine Steigerung des CD-Gehaltes von 20% auf 50% bewirkt eine Erhöhung der Konzentration des LA um

den Faktor 2,2. Für eine möglichst hochprozentige Lösung von Fomocain ist demzufolge eine 50% (m/V) Lösung von 2-HP- $\beta$ -CD notwendig. Mit den höher substituierten Derivaten entstanden Lösungen mit einem signifikant geringerem Gehalt an LA.



**Abbildung 11** Einfluss des Substitutionsgrades auf die Fomocain-Einbettung

Weiterhin wurde im Versuchsansatz ersichtlich, dass das CD mit dem geringsten Substitutionsgrad nicht nur eine erhebliche Konzentrationssteigerung an Fomocain bewirkt sondern auch annähernd um den gleichen Faktor bessere lösungsvermittelnde Eigenschaften aufweist als die Vergleichsderivate. 2-HP- $\beta$ -CD (DS 5,30) löst im Vergleich mit DS 7,68 erst im Bereich ab 40% (m/V) mehr Fomocain. Doch hier war die Gehaltssteigerung innerhalb der jeweiligen Substitutionsgrade nicht stark. Die Abbildung 11 veranschaulicht dies deutlich.

Die maximal erreichte Konzentration an Fomocain lag mit 32,78mg/ml = 105mmol/l (50% m/V 2-HP- $\beta$ -CD DS 4,30) unter dem in mehreren Ansätzen mit industriell gefertigtem, kommerziell erhältlichen 2-HP- $\beta$ -CD DS: 5,10 erreichten Gehalt von 41mg/ml = 132mmol/l. Da in dieser Versuchsreihe nur eine Tendenz getestet werden sollte und auch die Verbesserung der Löslichkeit in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad gezeigt werden konnte, wurde auf eine Ursachenanalyse des Konzentrationsunterschiedes verzichtet. Ein

möglicher Grund für den Unterschied wäre eine Verunreinigung des synthetisierten CD, z.B. mit Oligopropylenglycolen gewesen, die zu einer geringeren Einwaage an Substanz geführt hätte. Somit wäre der Gehalt von 50% (m/V) an 2-HP- $\beta$ -CD nicht mehr exakt gegeben. Die bei der Herstellung von substituierten CD angewandte Reinigungsmöglichkeit der Dialyse stand nicht zur Verfügung.

#### Verbesserung der Löslichkeit durch Zusatz von Wasserstrukturbildnern und –brechern

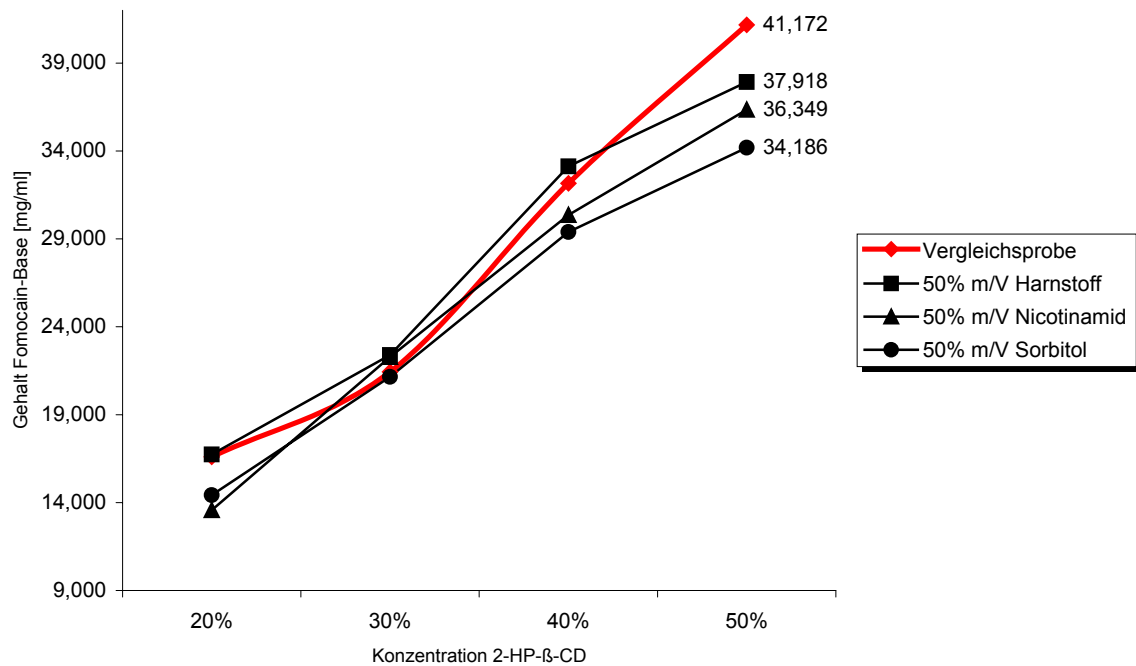
Wasserstrukturbildner und –brecher sind in der Lage, als Lösungsvermittler für schwer lösliche Stoffe zu fungieren. Müller et.al.<sup>47</sup> beschreiben einen additiven Effekt der Wasserstrukturbrecher Harnstoff und Nicotinamid als Zusatz zu CD, um eine bessere Löslichkeit von Substanzen zu erzielen. Gleichzeitig sollte der Einfluss eines Wasserstrukturbildners als Zusatz zum CD untersucht werden. Hierzu wurde der vicinale Alkohol Sorbitol verwendet.

Unter Mitführung einer Vergleichsprobe von kommerziell erhältlichem 2-HP- $\beta$ -CD wurden alle drei Substanzen unter identischen Bedingungen untersucht. Dabei wurde eine Konzentrationsreihe von 20%, 30%, 40% und 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD hergestellt und jeweils 50% (m/V) des Wasserstrukturbrechers oder –bildners zugewogen. Wie schon in den vorangegangenen Versuchen erfolgte die Gehaltsbestimmung für Fomocain nach Rühren, pH-Wert Einstellung und Filtration (0,2 $\mu$ m) mit der Methode des DAC.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 zusammengefasst. Es wird ersichtlich, dass durch die drei geprüften Zusätze keine Erhöhung der maximalen Konzentration an Fomocain erzielt wird. Sorbitol als Wasserstrukturbildner wirkte wie beschrieben über den gesamten Bereich der Testung, wenn auch nur in geringem Ausmaß, konzentrationserniedrigend auf Fomocain. Bemerkenswerte additive Effekte der Wasserstrukturbrecher Harnstoff und Nicotinamid sind über den gesamten Konzentrationsbereich an 2-HP- $\beta$ -CD nicht zu beobachten. Die ermittelten Steigerungen sind gering und liegen bei maximal 4,5% (Harnstoff / 30% 2-HP- $\beta$ -CD). Weiterhin ist keine Kontinuität in Konzentrationserhöhung bzw. –erniedrigung zu erkennen. Begünstigende Auswirkungen auf die Fomocainlöslichkeit konnten nicht erzielt werden. Möglicherweise sind diese bei geringen Konzentrationen an CD zu beobachten. In dieser Dissertation wurde jedoch als Ziel eine maximal erreichbare Konzentration an Fomocain in wässriger Lösung unter annähernden physiologischen Bedingungen angestrebt.

Eine Probe aus 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD in Ringer-Lösung, eingestellt auf einen pH-Wert von 7,40, besitzt mit 4,12% Fomocain-Base die höchste Konzentration dieses

schwerlöslichen Arzneistoffes. Damit war ein wichtiges Ziel der Arbeit erreicht worden.



**Abbildung 12** Einfluss von Wasserstrukturbrechern und -bildnern auf die Fomocain-Einbettung

### 3.1.3. Charakterisierung der Einschlussverbindung

Die entstandene 4%ige Lösung von Fomocain-Base bei neutralem pH-Wert war das Ergebnis einer Reihe unterschiedlicher Versuchsstrategien. Für den geplanten Einsatz im Rahmen einer Arzneimitteltherapie musste die gefundene Zubereitung nun genau charakterisiert werden.

#### 3.1.3.1. Bestimmung der Viskosität

Die Viskosität, Zähigkeit oder innere Reibung ist eine wichtige Größe zur Beschreibung von Fließeigenschaften von Stoffen. Man versteht darunter den Widerstand, den Moleküle oder kolloide Teilchen eines Stoffes ausüben, wenn sie gegeneinander verschoben werden. Hochviskose Lösungen sind durch ihre schlechte Filtrierbarkeit technologisch anspruchsvoller. Weiterhin würden diese zähen Zubereitungen praktisch schlechter anwendbar sein und zu Reizungen und Schmerzen an der Injektionsstelle führen.

Die Ergebnisse der Viskositätsbestimmung am Ubbelohde®-Kapillarviskosimeter sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Dabei wurden verschiedene 2-HP-β-CD Konzentrationen in

Phosphat-Puffer pH 2,5 untersucht. Der Puffer entsprach dem Trennmedium, das später zur Bindungskonstantenbestimmung mit Hilfe der CE verwendet wurde.

| Probe    | Konzentration<br>2-HP- $\beta$ -CD<br>[mg/ml] | Dichte<br>[g/ml] | Kinematische<br>Viskosität<br>[mm <sup>2</sup> /s] | Dynamische<br>Viskosität<br>[mPa x s] |
|----------|---|------------------|--|---------------------------------------|
| Wasser   |   | 0,9982           | 1,0059   | 1,0041                                |
| pH2,5_00 | 0   | 1,0030           | 1,0177   | 1,0208                                |
| pH2,5_10 | 10  | 1,0064           | 1,0638   | 1,0707                                |
| pH2,5_20 | 20  | 1,0093           | 1,0759   | 1,0859                                |
| pH2,5_30 | 30  | 1,0129           | 1,1137   | 1,1280                                |
| pH2,5_40 | 40  | 1,0158           | 1,1476   | 1,1657                                |
| pH2,5_50 | 50  | 1,0186           | 1,1958   | 1,2180                                |

**Tabelle 11** Dichte, Kinematische und Dynamischer Viskosität verschiedener 2-HP- $\beta$ -CD Konzentrationen

Erwartungsgemäß zeigte sich ein Anstieg von Dichte und Viskosität mit zunehmender Konzentration an CD. Dabei gab es zwischen 0% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD und 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD einen Unterschied von 20% Dynamischer Viskosität. Da die Probe mit der maximalen Konzentration an Cyclodextrin dennoch gut filtrierbar war und organoleptisch nicht durch eine extrem langsame Fließgeschwindigkeit auffiel, mussten weiterführende pharmakologische Versuche zeigen, ob die gestiegene Viskosität der Zubereitung ein pharmazeutisches Problem implizierte.

### 3.1.3.2. Bestimmung des Verhältnisses Fomocain-Base:2-HP- $\beta$ -CD

Die räumliche Struktur der CD ermöglicht wie unter 2.2. beschrieben verschiedene Zusammensetzungen der EV. Da für die Zubereitung aus Fomocain-Base und 2-HP- $\beta$ -CD eine Konzentration von 50% (m/V) notwendig war, wurde untersucht, in welchem Verhältnis der Arzneistoff mit dem Hilfsstoff interagiert, welches Verhältnis beide zueinander haben. Weiterhin sollten Aussagen über die Stabilität des Komplexes getroffen werden, einer entscheidenden Größe zur Charakterisierung der Zubereitung. Wäre die Affinität des Arzneistoffs zum 2-HP- $\beta$ -CD hoch, so würde es zu einer verzögerten Freisetzung aus der EV und somit zu einem verzögerten Wirkungseintritt kommen. Verschiedene Bestimmungsmöglichkeiten kamen dabei zu Einsatz

#### Berechnung

Mit Hilfe einer Formel konnte die Stabilität des Komplexes Fomocain-Base und 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD berechnet werden. Der Anstieg (SLOPE = 0,2612) wurde bei der Kalibrierung des HPLC-Systems zur Gehaltsbestimmung ermittelt. Voraussetzung zur

Berechnung war weiterhin die Kenntnis der Sättigungskonzentration ( $S_0 = 0,028 \text{ mmol/l}$ ) des Fomocain. Mit  $1262,7 \text{ M}^{-1}$  ist die Stabilität des untersuchten Komplexes gering.

$$K_c = \frac{SLOPE}{S_0 (1 - SLOPE)}$$

**Gleichung 1** Formel zur Berechnung der Stabilitätskonstante

Die rechnerisch ermittelte Konstante musste durch weitere Verfahren verifiziert werden.

### Titration

Die Bestimmung der Stabilitätskonstante und die gleichzeitige Ermittlung des stöchiometrischen Verhältnisses von Fomocain zu 2-HP- $\beta$ -CD wurden am Biozentrum der Universität Basel von Prof. Dr. Seelig durchgeführt. Der Methode liegt die Langmuir-Adsorptionsisotherme zu Grunde. Dabei wird die cyclodextrinhaltige Lösung (Sorbens) mit steigenden Konzentrationen an Fomocain versetzt. Vermessen wird die Absorption des freien, nicht im CD eingeschlossenen Wirkstoffs. Nach Langmuir gilt für die Adsorption von Stoffen an Oberflächen in einer monomolekularen Schicht:

$$x = \frac{x_m \cdot K \cdot c}{1 + K \cdot c}$$

**Gleichung 2** Langmuir Adsorptionsisotherme

Das Ergebnis Gleichung 2 der entspricht der sorbierten Menge. Während  $x_m$  die sorbierte Menge bei Sättigung (monomolekulare Schicht),  $C$  die Restkonzentration (freier Wirkstoff) und  $K$  die Bindungskonstante darstellt. Durch die Umformung der Gleichung 2 erhält man die Geradengleichung (s.u.):

$$\frac{c}{x} = \frac{1}{x_m K} + \frac{1}{x_m} c$$

Trägt man in einem Diagramm  $c/x$  gegen  $c$  auf und erhält eine Gerade, so ist nicht nur die Langmuir-Gleichung gültig sondern man kann auch aus der Steigung die maximal adsorbierte Menge berechnen (s.u.).

$$\tan \alpha = \frac{1}{x_m} \quad ; \quad x_m = \frac{1}{\tan \alpha}$$

Das Ergebnis von  $1360 \text{ M}^{-1}$  Bindungskonstante lag nahe bei dem rechnerisch ermittelten Befund.

Kapillarelektrophorese (CE)

Mit der CE stand ein elektrophoretisches Trennverfahren zur Verfügung, welches sich durch geringen Materialverbrauch, eine kurze Analysenzeit und hohe Trennleistung auszeichnet und dabei die Möglichkeit bietet, auch schwache Wechselwirkungen zu erfassen. Die Untersuchungen wurden am Institut für Pharmazie der FSU Jena in Zusammenarbeit mit Dr. Falko Süß aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Scriba durchgeführt.

Durch die Vorkenntnis der Bindungskonstanten aus der rechnerischen Ermittlung und durch die Titration war mit einem labilen Komplex zu rechnen. Der zu untersuchende Stoff (Fomocain-Base) wurde dabei dem Trennpuffer zugesetzt. Der Analyt bewegt sich während der elektrophoretischen Wanderung durch eine Phase konstanter Ligandenkonzentration (CD+Puffer). Dabei kommt es zur Einstellung des Adsorptions-Desorptions-Gleichgewichts. Die Mobilität des Fomocain ist dabei abhängig von der Konzentration des Liganden im Puffer.

Die ermittelte Stabilitätskonstante war mit  $638 \text{ M}^{-1}$  in einem deutlich niedrigeren Bereich. Bestätigt wurde jedoch die schwache Affinität des Fomocain zum 2-HP- $\beta$ -CD und das stöchiometrische Verhältnis von 1:1.

| Substanz           | Verfahren der Bestimmung |                       |                      |                                      |
|--------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------------|
|                    | Berechnung               | Titration             | CE                   | unbekannt                            |
| <b>Fomocain</b>    | $1263 \text{ M}^{-1}$    | $1360 \text{ M}^{-1}$ | $638 \text{ M}^{-1}$ |                                      |
| <b>Digitoxin</b>   |                          |                       |                      | $18000 \text{ M}^{-1}$ <sup>48</sup> |
| <b>Cholesterol</b> |                          |                       |                      | $19000 \text{ M}^{-1}$ <sup>49</sup> |

**Tabelle 12** Bindungskonstanten des Fomocain im Vergleich mit anderen schwerlöslichen Stoffen

Als Ergebnis der Untersuchungen konnte formuliert werden, dass der Komplex aus Fomocain mit 2-HP- $\beta$ -CD eine geringe Stabilität aufweist. Wobei die absoluten Werte auf Grund der unterschiedlichen Methoden nicht vergleichbar waren. Es bestand keine hohe Affinität des Arzneistoffs zum Liganden. Eine verzögerte Freisetzung aus dem Komplex nach der Applikation wäre demzufolge nicht zu erwarten. Begründungen für den notwendigen hohen Zusatz an 2-HP- $\beta$ -CD konnten nur über die Raumstruktur der Einschlussverbindung gesucht werden.

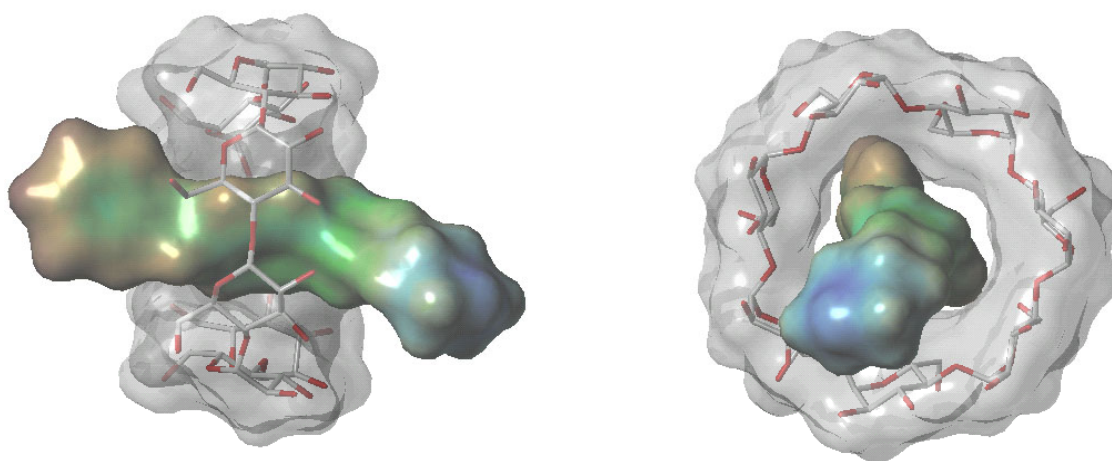
Molecular Modelling

In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Hilgenfeld, jetzt Universität zu Lübeck, Direktor des Instituts für Biochemie, wurde mit Herrn Dr. Hillisch eine Modellierung der Wechselwirkung von Fomocain mit  $\beta$ -CD durchgeführt. Der



Rückgriff auf  $\beta$ -CD erfolgte, weil auch meine Untersuchungen gezeigt hatten, dass bei der Umsetzung von  $\beta$ -CD mit Propylenoxid jeweils unterschiedlich substituierte Derivate und keine Reinsubstanz entsteht. Die 3D-Struktur  $\beta$ -CD wurde dabei der Cambridge Crystallographic Database entnommen. Die Struktur von Fomocain wurde über Kraftfeldansätze berechnet. Die Interaktion von  $\beta$ -CD mit Fomocain wurde durch Docking vorhergesagt.

Der 1:1 Komplex bestätigte sich auch bei dieser Untersuchung. Es zeigte sich, dass der zentrale lipophile Phenylrest - nicht der Exoring - des Fomocain im Zentrum des  $\beta$ -CD zu liegen kommt. Der polare Morpholinrest (blau) sowie die apolare Phenoetherkomponente (braun) ragen aus der Kavität heraus. Die Abbildung 13 zeigt zwei unterschiedliche Ansichten des vorhergesagten Komplexes. Dabei ist das lipo- bzw. hydrophile Potenzial von Fomocain als Farbcode auf die Moleküloberfläche projiziert (lipophil = braun, hydrophil = blau).



**Abbildung 13** Modell des Fomocain- $\beta$ -CD-Komplexes

Das Molecular Modelling bestätigte zum einen die vermutete 1:1-Zusammensetzung des Arzneistoff-Hilfsstoff-Komplexes. Es führte aber gleichzeitig auch zu weiteren Ergebnisinterpretationen der bisher erhobenen Daten. Wie ermittelt, wird Fomocain-Substanz nur durch geringe Bindungskräfte im Komplex gehalten. Nach den Erkenntnissen über die Raumstruktur scheint Fomocain ungehindert die Kavität des  $\beta$ -CD passieren zu können. Um genügend schwer lösliches Lokalanästhetikum in Lösung zu halten, ist demzufolge eine hohe, keine zum Arzneistoff äquimolare Konzentration an 2-HP- $\beta$ -CD notwendig, um das Fomocain nach dieser Passage wieder aufzunehmen und permanent in Lösung zu halten. Eine Präzipitation der Fomocain-Base wird somit verhindert. Weiterhin erklärt dies auch den geringen Einfluss niedriger CD-Konzentrationen (Abbildung 10,

Seite 26) auf die Erhöhung der Löslichkeit des Fomocain. Der postulierte additive Effekt von Wasserstrukturbrechern<sup>47</sup> auf den CD-Komplex wurde bei meinen Untersuchungen nicht bestätigt (Abbildung 11, Seite 28). Auch hierfür dürfte die Ursache in der Raumstruktur und den wahrscheinlichen Bindungsverhältnissen im Fomocain-2-HP- $\beta$ -CD-Komplex zu suchen sein. Möglicherweise besetzen diese Moleküle die Kavitäten des CD, die notwendig sind, um den Arzneistoff in der Lösung zu halten.

### 3.1.3.3. Stabilität der Zubereitung

Arzneimittel können verschiedenen chemischen, physikalischen oder mikrobiellen Veränderungen unterliegen. Dabei kann sich der Wirkstoff zersetzen, in Wechselwirkung mit anderen beteiligten Zusätzen oder dem Primärpackmittel treten. Äußere Einflüsse wie Licht, Sauerstoff, Luftfeuchte und Temperaturbelastung können solche Instabilitäten auslösen oder verstärken. Da gewährleistet sein muss, dass der Patient voll wirksame und unbedenkliche Arzneimittel erhält, sind Haltbarkeitstests mit dem Präparat erforderlich. Die Beurteilung der Stabilität erfolgt dabei nach dem Wirkstoffgehalt, der Reinheit, organoleptisch wahrnehmbaren Veränderungen und mikrobiellen Eigenschaften.

Cyclodextrinhaltige Lösungen sind auf Grund des hohen Zuckergehaltes ideale Nährböden für Mikroorganismen. Die neu hergestellte Fomocainzubereitung in 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD in Ringer-Lösung wurde unterschiedlichen thermischen Belastungen ausgesetzt und anschließend mind. 100 d bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz gelagert. Die unbehandelte Probe hatte zwar noch 100% Wirkstoffgehalt, zeigte keine Präzipitation von Fomocain-Base oder anderen Zusätzen, war jedoch stark mikrobiell befallen. Auf der Oberfläche der Lösung war ein deutliches Pilzmycel sichtbar. Eine Probe gleicher Zusammensetzung wurde 1 h bei 50°C behandelt. Nach Ablauf des Lagerzeitraumes betrug die Wirkstoffwiederfindung 100%, es war keine organoleptisch wahrnehmbare Veränderung eingetreten und es war keine Beeinflussung durch Mikroorganismen nachweisbar. Eine dritte identische Zubereitung wurde der Dampfsterilisation (EuAB 1997, 15min 121°C) unterworfen. Die hohe Temperatur hatte keine Auswirkung auf die Substanzen. Es waren keine Veränderungen der Reinheit durch Spaltprodukte, wie sie für saure Fomocain-Lösungen nach thermischer Belastung beobachtet worden sind, nachweisbar. Nach Ablauf der Lagerdauer betrug der Wirkstoffgehalt auch hier noch 100%. Es war keine Auskristallisation erkennbar und kein mikrobieller Befall vorhanden.

Da wasserhaltige Zubereitungen generell anfällig für Mikroorganismen sind, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, sie technologisch aufzuarbeiten. Mit der Methode der Gefriertrocknung steht dabei ein Verfahren zur Verfügung, welches schonend das Wasser aus Proben zu entfernen vermag ohne dabei empfindliche Stoffe zu zerstören. Die Lyophilisatbildung gelang bei der Fomocain-2-HP- $\beta$ -CD-Zubereitung problemlos. Das entstandene leicht gelbliche Pulver war problemlos und sofort klar lösbar. Es entstand nach Zugabe des Lösungsmittels Wasser das gleiche Ausgangsprodukt, bewiesen u.a. durch DC- und HPLC-Analytik.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine Wärmebehandlung (1 h 50°C oder Dampfsterilisation) der untersuchten Zubereitung absolut notwendig ist, um diese vor mikrobiellem Befall zu schützen und sie darf keinen negativen Einfluss auf die anderen Zusätze haben. Die Produktion von Lyophilisat erscheint zwar technisch aufwendig, hat aber den großen Vorteil, dass im Endprodukt kein Wasser vorhanden und somit bakterielles Wachstum ausgeschlossen ist und z.B. hydrolytische Reaktionen nicht mehr stattfinden können.

#### **3.1.3.4. Einfluss von 2-HP- $\beta$ -CD auf die Plasmaeiweißbindung des Fomocain**

Auf die Bedeutung der Plasmaeiweißbindung von Xenobiotika soll in Kapitel 3.2.2.1. bei den Untersuchungen der Fomocain-Analoga näher eingegangen werden. Für die Arzneistoffformulierung von Fomocain-Base mit 2-HP- $\beta$ -CD musste geklärt werden, ob durch die Komplexbildung von Arzneistoff mit CD eine Veränderung der Plasmaeiweißbindung (PEB) von Fomocain zu beobachten ist. Untersuchungen belegen<sup>49</sup>, dass zwei simultane, konkurrierende Einflüsse auf den Arzneistoff-CD-Komplex existieren. Zum einen ist es die Konkurrenz zwischen CD und Plasmaproteinen, einen Komplex mit dem Arzneistoff zu bilden, zum anderen die Verdrängung des Xenobiotikums aus dem CD-Komplex durch endogene, hydrophobe Moleküle wie Cholesterol oder Triglyceride. In Abhängigkeit von der Komplexstabilität wird einer der Prozesse bevorzugt ablaufen und somit zu messbaren Veränderungen führen.

Die PEB des Fomocain wurde mit 99,0% bestimmt. In der Formulierung mit 2-HP- $\beta$ -CD sank die Bindung an Plasmaproteine auf 95,14%. Diese unbedeutende Reduzierung der hohen PEB des Lokalanästhetikums Fomocain lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Komplexstabilität zwischen dem Arzneistoff und den Plasmaproteinen größer sein muss als die zwischen 2-HP- $\beta$ -CD und Fomocain. Die ermittelten geringen

Komplexbildungskonstanten (Tabelle 12, Seite 33) ließen dies schon im Voraus vermuten. Der Arzneistoff kann also leicht aus dem Komplex mit dem CD abgegeben werden, ohne dass eine Initialphase ohne Freigabe von Wirkstoff zu erwarten ist. Dies hat gerade im Hinblick auf den pharmazeutischen Einsatz eine immense Bedeutung. Die Komplexstabilitätskonstante von 2-HP- $\beta$ -CD mit Cholesterol ist weiterhin mit  $19.000\text{M}^{-1}$  sehr hoch. Ein Austausch der eingeschlossenen Verbindungen ist demnach sehr wahrscheinlich, denn nur freigesetzter Arzneistoff kann wieder an Plasmaproteine gebunden werden.

### 3.1.3.5. Pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen

Die pharmakologisch-toxikologischen Eigenschaften des Fomocain sind in der Literatur ausführlich beschrieben. Die Substanz bewirkt eine ausgeprägte Oberflächenanästhesie wie Tetracain, eine Leitungsanästhesie wie Procain und besitzt eine sehr geringe Toxizität ( $\text{LD}_{50} = 250\text{mg/kg KG}$ ). Im Rahmen der Dissertation musste geklärt werden, ob der Zusatz von 2-HP- $\beta$ -CD zu signifikanten Veränderungen der pharmakologischen Eigenschaften oder toxikologischen Parameter führt, denn mit der EV war es erstmalig möglich eine gewebsneutrale Zubereitung zu testen, ohne dass eine Präzipitation der Fomocain-Base eintrat. Auskristallisation im Versuchstiergewebe und die damit verbundenen Irritationen und Nekrosen sind dokumentierte Probleme bei Testungen von Fomocain<sup>61</sup>.

Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena durchgeführt und sind bereits veröffentlicht<sup>50, 60</sup> worden. In allen Versuchsreihen wurde eine Lösung von Fomocain-Base in Tylose mit der cyclodextrinhaltigen Zubereitung verglichen. Als Referenzsubstanzen dienten Procain für die Leitungsanästhesie bzw. Tetracain für die Oberflächenanästhesie. Untersucht wurden die Leitungs- und Oberflächenanästhesie, die Paresedauer und die  $\text{LD}_{50}$ . Des Weiteren galt es, den möglichen Eigeneffekt des 2-HP- $\beta$ -CD auszuschließen und zu klären, ob eine verzögerte Freisetzung des Fomocain aus dem Arzneistoff-Hilfsstoff-Komplex erfolgt.

#### Bestimmung der Leitungsanästhesie am Nervus ischiadicus der Ratte

Die Testung am Nervus ischiadicus der Ratte simuliert nach allgemeiner Erfahrung die größtmögliche Ähnlichkeit zwischen tierexperimentellem Prüfmodell und klinischer Praxis. So können brauchbare Rückschlüsse auf die tatsächliche Anwendbarkeit einer neuen Substanz in der Humanmedizin gezogen werden. Weiterhin eignet sich die Ratte als

Versuchstier, weil die hier gemessene Anästhesiedauer der beim Menschen ermittelten relativ nahe kommt.

Nach der Applikation der jeweiligen Substanz wurde alle 2 min die Pfote des Tiers gereizt. Die Anästhesie galt als beendet, wenn die Ratte wieder auf äußere Reize mit einem Wegziehreflex reagierte.

#### Bestimmung der Parese am Nervus ischiadicus der Ratte

Die Parese (gr. paresis Erschlaffung) ist ein indirektes Maß für die Toxizität einer Substanz. Eine lange Paresedauer wird als ungünstiges Toxizitätsmerkmal einer Substanz bewertet. Gleichzeitig ist es notwendig, die Parese von der Anästhesie abzugrenzen. So kann es trotz langer Erschlaffung der Gliedmaßen zu keiner Anästhesie kommen.

Als Ende der Parese wurde gewertet, wenn die Pfote des Tieres wieder Halt auf den Gitterstäben des Käfigs fand.

#### Bestimmung der Oberflächenanästhesie an der Cornea der Ratte

Da in der Cornea die Nervenfasern ungeschützt im Gewebe liegen, wird durch Auftropfen einer lokalanästhetisch wirkenden Substanz eine Anästhesie erreicht. Durch Eindellung der Cornea mittels einer Sonde wird ein Reiz gesetzt, welcher zum Cornealreflex (Lidschluss) führt. Die Lösungen der Substanzen wurden in das Auge getropft und dort nach einer Verweildauer von 1 min mit Isoton. NaCl Lösung ausgespült. Die Anästhesie galt als beendet, wenn das Tier bei mindestens 3 von 10 innerhalb von 4 Sekunden gesetzter Reize reagierte.

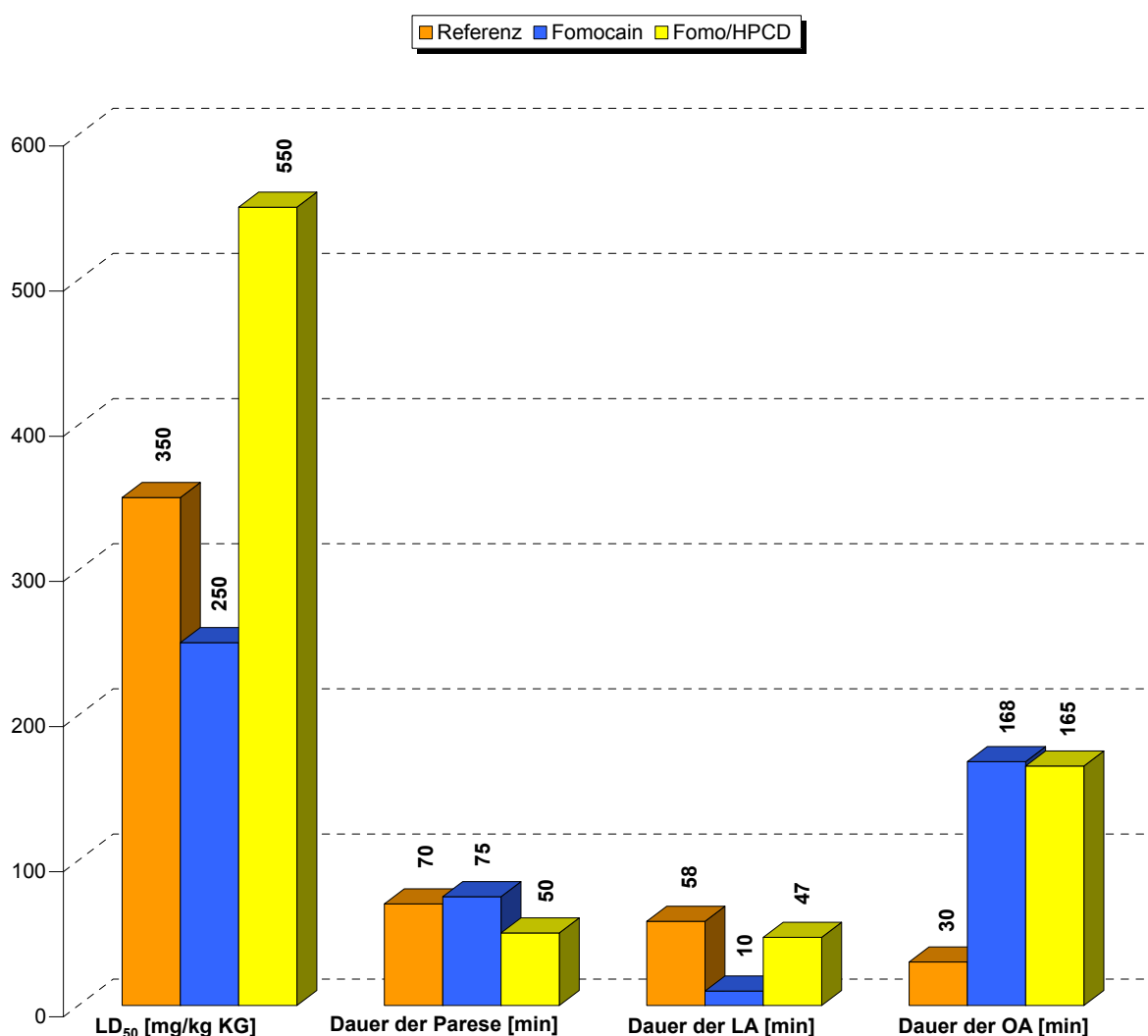
#### Bestimmung der LD<sub>50</sub> an der Ratte

Lokalanästhetika können bei falscher Applikation oder Überdosierung zu systemisch toxischen Effekten führen. Mögliche Schäden können am Herz-Kreislauf-System und am ZNS sowie an anderen Organen auftreten und sogar zum Tod führen. Die Dosis letalis (LD<sub>50</sub>) ist definitionsgemäß der Wert, bei dem 50% der behandelten Versuchstiere eines Kollektivs getötet werden. Sie ist ein Maß für die Toxizität einer Substanz.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 zusammengefasst. Dabei wird deutlich, dass sich durch den cyclodextrinhaltigen Zusatz die Toxizität des Fomocain verringert. Die Paresedauer sinkt von 75min auf 50min und der LD<sub>50</sub>-Wert ist mit 550mg/kg KG deutlich

höher als der des Fomocain (250mg/kg KG) ohne einschlussbildenden Zusatz. Bei annähernd gleicher Oberflächenanästhesie zeichnet sich die 2-HP- $\beta$ -CD-haltige Zubereitung durch eine bessere Leitungsanästhesie im Vergleich zur Nichteinschlussverbindung aus. Der Hilfsstoff selbst war ohne pharmakologischen oder toxikologischen Effekt. Eine Latenz, verursacht durch eine verzögerte Freigabe des Wirkstoffs, wurde nicht beobachtet.

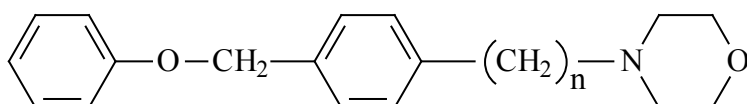
Neben den verbesserten pharmazeutischen Eigenschaften überzeugte die neue Lösung aus Fomocain mit 2-HP- $\beta$ -CD durch ausgezeichnete pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften. Es steht somit eine neue wirksame Zubereitung zur Verfügung, die umfassend charakterisiert ist und das Spektrum der Lokalanästhetika erweitern kann.



**Abbildung 14** Vergleich der Pharmakologisch-toxikologische Daten von Fomocain und der Fomocain-2-HP- $\beta$ -CD-Zubereitung (2%ige Lösungen)

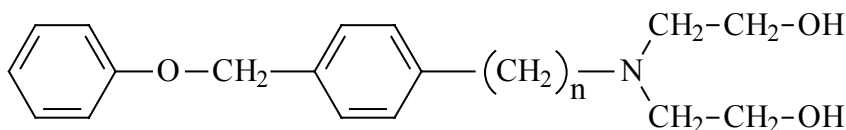
### Fomocain-Analoga in einer parenteralen Zubereitung

Neben Fomocain standen mir sieben weitere Fomocain-Derivate zur Verfügung, die auf ihre Eignung als Lokalanästhetika getestet wurden. Alle in Tabelle 13 und 14 geführten Verbindungen wurden umfassend charakterisiert, wobei Fomocain trotz z.T. bekannter Kenngrößen stets als Vergleich mit untersucht wurde. Einige weiterführende Untersuchungen erfolgten nur mit ausgewählten, Erfolg versprechenden Derivaten und wurden gesondert gekennzeichnet.



| Derivat / Code                          | Kettenlänge |
|---|-------------|
| <b>A: Morpholin als Basenkomponente</b> |             |
| OE 5000                                 | n = 1       |
| OE 500                                  | n = 2       |
| Fomocain                                | n = 3       |
| OE 1000                                 | n = 4       |

**Tabelle 13** Fomocain-Derivate mit Morpolin-Rest



| Derivat / Code                              | Kettenlänge |
|---|-------------|
| <b>B: Diethanolamin als Basenkomponente</b> |             |
| OE 8000                                     | n = 1       |
| OE 6000                                     | n = 2       |
| OE 7000                                     | n = 3       |
| OE 9000                                     | n = 4       |

**Tabelle 14** Fomocain-Derivate mit Diethanolamin-Rest

#### 3.1.4. Physikalisch-chemische Parameter

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Arzneistoffs sind für sein Gesamtverhalten im Organismus von großer Bedeutung. Besonders die Resorptions- und Verteilungsphase werden durch diese Parameter beeinflusst. Den zahlreichen physikalisch-chemischen Eigenschaften kommen dabei unterschiedliche Gewichtungen zu.

Lokalanästhetika werden unmittelbar am Wirkort appliziert. Daher spielt die Resorption keine große Rolle. Eine Aufnahme in den Blutkreislauf wäre dagegen unerwünscht, da es

sonst zu systemischen Nebenwirkungen kommen kann. Wirk- und Applikationsort sind nicht genau identisch. So müssen auch die Lokalanästhetika intrazelluläre Zwischenräume, Membranen und Zellwände überwinden. Eine Optimierung und Charakterisierung der physikalisch-chemischen Eigenschaften ist daher hilfreich, wenn ein neuer Arzneistoff in die Therapie eingeführt werden soll.

### 3.2.1.1. Bestimmung der Löslichkeit

Die Wasserlöslichkeit einer Substanz beeinflusst neben dem Säure-Base-Gleichgewicht und der Lipidlöslichkeit die Wirkung einer Substanz. Eine Ausfällung im Gewebe, hervorgerufen durch eine Erhöhung des deprotonierten Wirkstoffanteils, kann zu Unverträglichkeitsreaktionen, wie z.B. zu Nekrosen, führen. Umgekehrt führt ein pH-Werterniedrigung durch entzündliche Prozesse zum Anstieg der protonierten Komponente und somit zur Verminderung der Konzentration der diffusionsfähigen freien Base.

|  | Löslichkeit in Aqua. dest.<br>(pH 5,00) | Löslichkeit in<br>Phosphat- Puffer<br>(pH 7,40; EuAB) |
|--|---|---|
| <b>Hydrochloride</b>                       |   |   |
| <b>A Morpholin als Basenkomponente</b>     |   |   |
| OE 5000                                    | leicht löslich                          | unlöslich   |
| OE 500                                     | wenig löslich                           | unlöslich   |
| Fomocain                                   | leicht löslich                          | unlöslich   |
| OE 1000                                    | löslich                                 | unlöslich   |
| <b>B Diethanolamin als Basenkomponente</b> |   |   |
| OE 8000                                    | leicht löslich                          | leicht löslich  |
| OE 6000                                    | leicht löslich                          | leicht löslich  |
| OE 7000                                    | leicht löslich                          | leicht löslich  |
| OE 9000                                    | leicht löslich                          | leicht löslich  |
| <b>Basen</b>                               |   |   |
| <b>A Morpholin als Basenkomponente</b>     |   |   |
| OE 5000                                    | unlöslich                               | unlöslich   |
| OE 500                                     | unlöslich                               | unlöslich   |
| Fomocain                                   | unlöslich                               | unlöslich   |
| OE 1000                                    | unlöslich                               | unlöslich   |
| <b>B Diethanolamin als Basenkomponente</b> |   |   |
| OE 8000                                    | unlöslich                               | unlöslich   |
| OE 6000                                    | unlöslich                               | unlöslich   |
| OE 7000                                    | unlöslich                               | unlöslich   |
| OE 9000                                    | unlöslich                               | unlöslich   |

**Tabelle 15** Löslichkeit der Derivate nach EuAB 1997



In Tabelle 15 wurde das Löslichkeitsverhalten aller geprüften Basen und Hydrochloride zusammengefasst. Alle Hydrochloride sind im leicht sauren destillierten Wasser gut bis sehr gut löslich. Auch die Hydrochloride mit Diethanolamin-Rest waren bei der Testung in Phosphat-Puffer (pH 7,4) gut löslich, während die Hydrochlorid-Derivate mit Morpholin-Rest unter diesen Bedingungen praktisch unlöslich waren. Die Base präzipitierte und blieb beständig als Bodensatz sichtbar. Dieser Befund wurde durch die Testung der Basen unter den gleichen Bedingungen bestätigt.

Lediglich OE 8000, OE 6000, OE 7000 und OE 9000 konnten durch ausreichende Wasserlöslichkeit auch im physiologischen pH-Bereich überzeugen. Für alle anderen waren Nebenwirkungen durch Ausfällung der Base im Gewebe zu erwarten bzw. eine Testung am Tiermodell durch unzureichende Konzentrationen unmöglich.

### 3.2.1.2. Bestimmung der $pK_a$ -Werte

Die meisten Lokalanästhetika sind organische Basen und damit Protonenakzeptoren. In Abhängigkeit von ihrem  $pK_a$ -Wert und dem pH-Wert des Milieus liegen sie in hydrophiler, protonierter Form (Basenkation) oder lipophiler, ungeladener Form (freie Base) vor. Je schwächer basisch ein Wirkstoff ist, desto größer ist der ungeladene Anteil bei physiologischem pH. Nur diese Form ist in der Lage, biologische Barrieren zu passieren. Für die Wirkung am Ionenkanal ist wiederum ein genügend hoher Anteil an protonierter Form notwendig. Die Basizität muss somit in einem eng begrenzten Bereich liegen. Sie wird ausgedrückt durch den  $pK_a$ -Wert der korrespondierenden Säure. Gebräuchliche Lokalanästhetika weisen  $pK_a$ -Werte zwischen 7,0 und 9,5 auf.

| Derivat                                     | $pK_a$ -Wert |
|---|--------------|
| <b>A: Morpholin als Basenkomponente</b>     |              |
| OE 5000                                     | 6,86         |
| OE 500                                      | 6,85         |
| Fomocain                                    | 7,24         |
| OE 1000                                     | 7,23         |
| <b>B: Diethanolamin als Basenkomponente</b> |              |
| OE 8000                                     | 7,62         |
| OE 6000                                     | 7,94         |
| OE 7000                                     | 8,55         |
| OE 9000                                     | 8,37         |

Tabelle 16  $pK_a$ -Werte der Derivate

Für die untersuchten Fomocain-Analoga wurde ein  $pK_a$ -Wert im Bereich 6,8 bis 8,4 ermittelt. Bedingt durch die Morpholin-Komponente im Molekül, zeigten die ringgeschlossenen Derivate eine höhere Basizität. Die hydrophileren Diethanolamin-Derivate waren durch  $pK_a$ -Werte  $>7,4$  gekennzeichnet. Für diese Produkte war somit ein günstiges Verhältnis zwischen protonierter und deprotonierter Form bei physiologischem pH-Wert zu erwarten. Dieses Gleichgewicht war rechnerisch sogar deutlich zur Seite des Basenkations verschoben. Dies hätte neben einer wesentlich besseren Wasserlöslichkeit (siehe 3.2.1.2.) auch eine direkte Wirkung am Applikationsort zur Folge. Nur lipophile Anteile würden sofort abtransportiert werden und zu Nebenwirkungen führen.

| Derivat                                     | Ionisationsgrad<br>(%, pH 7,40) |                 |
|---|---------------------------------|-----------------|
|   | B                               | BH <sup>+</sup> |
| <b>A: Morpholin als Basenkomponente</b>     |                                 |                 |
| <b>OE 5000</b>                              | 78,14                           | 21,86           |
| <b>OE 500</b>                               | 78,01                           | 21,99           |
| <b>Fomocain</b>                             | 59,11                           | 40,89           |
| <b>OE 1000</b>                              | 59,66                           | 40,34           |
| <b>B: Diethanolamin als Basenkomponente</b> |                                 |                 |
| <b>OE 8000</b>                              | 37,60                           | 62,40           |
| <b>OE 6000</b>                              | 22,38                           | 77,62           |
| <b>OE 7000</b>                              | 7,53                            | 92,47           |
| <b>OE 9000</b>                              | 9,68                            | 90,32           |

Tabelle 17 Ionisationsgrad der Derivate bei physiologischem pH-Wert

### 3.2.1.3. Bestimmung der Trübungs-pH-Werte

Unter Trübungs- oder Fällungs-pH versteht man den pH-Wert, bei dem die erste bleibende Trübung in einer Lösung durch ausfallende freie Base auftritt, wenn die Hydrochlorid-Lösung mit Lauge titriert wird. Er ist ein analytisches Kriterium für die Wasserlöslichkeit der lipophilen freien Base, das durch KOELZER und WEHR eingeführt worden ist. Abhängig ist der Trübungs-pH von dem  $pK_a$ -Wert, der Löslichkeit der Verbindung, der Temperatur, der Konzentration, sowie der Ionenstärke der Lösung.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 18 übersichtlich dargestellt. Wie nach den vorangegangenen Versuchen zu erwarten war, waren die Basen der Derivate mit Morpholin-Komponente durch deutlich niedrigere Trübungs-pH-Werte gekennzeichnet. Die ermittelten pH-Werte lagen im Bereich von 5,1 bis 5,7. Diese Befunde ließen die Vermutung zu, dass eine Anwendung unter physiologischen Bedingungen schwierig oder unmöglich ist, da mit der Präzipitation der Base und damit einer Reizung des Gewebes zu

rechnen war. Die Fomocain-Analoga mit Diethanolamin-Basenanteil überzeugten durch Trübungs-pH-Werte im physiologischen pH-Bereich. Nebenwirkungen durch ausfallende Base waren also nicht bzw. nur in geringem Umfang zu erwarten.

| Derivat                                     | Trübungs-pH-Wert |
|---|------------------|
| <b>A: Morpholin als Basenkomponente</b>     |                  |
| OE 5000                                     | 5,37             |
| OE 500                                      | 5,50             |
| Fomocain                                    | 5,70             |
| OE 1000                                     | 5,13             |
| <b>B: Diethanolamin als Basenkomponente</b> |                  |
| OE 8000                                     | 7,09             |
| OE 6000                                     | 7,16             |
| OE 7000                                     | 7,67             |
| OE 9000                                     | 7,49             |

Tabelle 18 Trübungs-pH-Werte der Derivate

Da der Trübungs-pH-Wert in direktem Zusammenhang mit dem  $pK_a$ -Wert steht, kann die Wasserlöslichkeit einer Verbindung mit Hilfe der Puffergleichung nach Henderson-Hasselbalch berechnet werden. Die gesuchte Konzentration erscheint durch Umformen der Gleichung als Lösung.

$$[B] = \frac{S}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

Für eine Substratkonzentration  $[S]$  von  $10^{-3}$  M ergaben sich die in Tabelle 19 dargestellten Basenlöslichkeiten  $[B]$ . Eine experimentelle Überprüfung erfolgte für die Verbindungen Fomocain und OE 7000 mit Hilfe der HPLC-Analytik. Dabei ergaben sich für Fomocain 0,020mg/ml (= 0,0653mmol/l) und für OE 7000 0,0538mg/ml (=0,164mmol/l). Beide Werte demonstrieren die Richtigkeit der rechnerischen Methode.

|   | Basenlöslichkeit<br>[mmol/l] | Basenlöslichkeit<br>[mg/l] / [mg/ml] |
|---|------------------------------|--------------------------------------|
| <b>A: Morpholin als Basenkomponente</b>     |                              |                                      |
| OE 5000                                     | 0,0313                       | 8,858 / 0,009                        |
| OE 500                                      | 0,0428                       | 12,712 / 0,013                       |
| Fomocain                                    | 0,0280                       | 8,718 / 0,009                        |
| OE 1000                                     | 0,0079                       | 2,561 / 0,003                        |
| <b>B: Diethanolamin als Basenkomponente</b> |                              |                                      |
| OE 8000                                     | 0,2279                       | 68,59 / 0,069                        |
| OE 6000                                     | 0,1423                       | 44,84 / 0,045                        |
| OE 7000                                     | 0,1368                       | 45,01 / 0,045                        |
| OE 9000                                     | 0,1165                       | 39,95 / 0,040                        |

Tabelle 19 Errechnete Wasserlöslichkeit der Derivate

### 3.2.1.4. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Der Verteilungskoeffizient beschreibt annähernd die Wahrscheinlichkeit, mit der sich eine Verbindung in lipophilen oder hydrophilen Bereichen aufhält. Für die Bewertung von Lokalanästhetika kommt dem pH-abhängigen distribution coefficient D jedoch die größere Bedeutung zu als dem Nernstschen partition coefficient P. Während P das Verhalten in Wasser kennzeichnet, beschreibt D die Verteilung in Abhängigkeit vom Milieu. Von Interesse für die durchgeführten Untersuchungen war der physiologische pH-Wert. Beide Kenngrößen einer Verbindung stehen in unmittelbarem Zusammenhang und sind des weiteren vom  $pK_a$ -Wert abhängig.

$$\lg D = \lg P - \lg(1 + 10^{pK_a - pH})$$

**Gleichung 3** Verteilungskoeffizient

Nach TAYLOR und CRUICKSHANK<sup>51</sup> geht mit steigendem Verteilungskoeffizienten eine Wirkungszunahme einher. Wichtiger jedoch ist eine gewisse Balance zwischen lipophiler und hydrophiler Komponente, damit es nicht durch überwiegende Lipophilie zur Anreicherung im Gewebe kommt bzw. durch unzureichende Wasserlöslichkeit keine Permeation durch das Cytoplasma möglich ist.

Bestimmt wurde das Verteilungsverhalten der Derivate auf einem HPLC-System. Zugrunde liegt hier, dass Absorptionsvorgänge ausgeschlossen werden und eine lineare Abhängigkeit zwischen der Retentionszeit einer Verbindung und deren  $\lg P$  besteht. Nach Gleichung 3 konnte  $\lg D$  berechnet werden. Die Methode ist bei ausreichender Genauigkeit zeitsparend im Vergleich zum aufwendigen Verfahren des Ausschüttelns mit n-Octanol.

| Derivat                                     | $\lg P$ | $\lg D$ (pH 7,4) |
|---|---------|------------------|
| <b>A: Morpholin als Basenkomponente</b>     |         |                  |
| OE 5000                                     | 3,49    | 3,38             |
| OE 500                                      | 3,65    | 3,54             |
| Fomocain                                    | 3,87    | 3,64             |
| OE 1000                                     | 4,20    | 3,98             |
| <b>B: Diethanolamin als Basenkomponente</b> |         |                  |
| OE 8000                                     | 2,43    | 2,01             |
| OE 6000                                     | 2,58    | 1,93             |
| OE 7000                                     | 2,77    | 1,59             |
| OE 9000                                     | 3,02    | 2,01             |

**Tabelle 20**  $\lg P$ - und  $\lg D$ -Werte der Derivate

Die distribution coefficients der untersuchten Fomocainanaloga unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Basenkomponente beträchtlich. Die Diethanolaminderivate waren durch eine wesentlich geringere Lipophilie gekennzeichnet als die Morpholin-Verbindungen. Alles in allem bestätigte die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten sämtliche anderen ermittelten physiko-chemischen Parameter.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle untersuchten Verbindungen die an die Basizität eines Lokalanästhetikums zu stellenden Anforderungen erfüllen. Die aus dem  $pK_a$ -Wert einer Substanz resultierenden Eigenschaften (Ionisationsgrad bei verschiedenen pH-Werten, die Wasserlöslichkeit, das Verteilungsverhalten) ergeben ein differenziertes Bild. Demnach sind die Derivate mit Diethanolamin-Rest für eine Anwendung unter physiologischen Bedingungen geeigneter.

### **3.2.2. Ergebnisse der biopharmazeutischen Untersuchungen**

In Abhängigkeit von Applikationsart und -ort unterliegt ein Arzneistoff im Körper verschiedenen Prozessen, die die Pharmakodynamik entscheidend beeinflussen können. Das sogenannte LADME-Modell beschreibt den Weg nach oraler Aufnahme. Während die Liberation vorwiegend technologisch beeinflusst werden kann, sind Absorption (Resorption), Distribution, Metabolisierung und Elimination weitgehend von den physiko-chemischen Eigenschaften der Substanz abhängig.

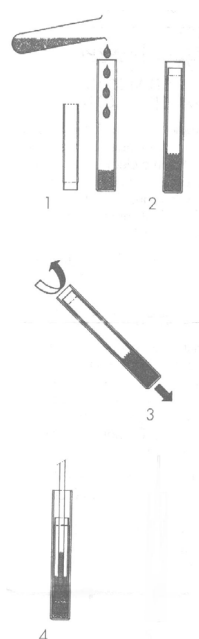
#### **3.2.2.1. Bindung der Derivate an Plasmaeiweiße im Humanserum**

Die Bindung von Wirkstoffen an Proteine des Blutplasmas hat ein verändertes Verteilungsverhalten und damit ein verändertes Wirkprofil zur Folge. Nur der freie Arzneistoff wird verteilt und kann seinen pharmakodynamischen Effekt bewirken. Trotz der Reversibilität der Protein-Arzneistoff-Bindung führen starke PEB zu einer längeren Zirkulation der Xenobiotika im Blutkreislauf.

Die Bestimmung der Proteinbindung kann durch direkte und indirekte Methoden erfolgen. Mit der direkten Methode wird der ungebundene freie Anteil an der Gesamtkonzentration von einem im Gleichgewicht stehenden System Protein-Wirkstoff bestimmt. Häufig eingesetzte Verfahren sind dabei Gleichgewichtsdialyse und die Ultrafiltration. Den indirekten Methoden liegen die durch die Bindung an Proteine bedingten Änderungen der UV-Absorption, der Fluoreszenz oder des Circular dichroismus zugrunde.

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren der Ultrafiltration gewählt. Dabei kam Centrisart® I der Firma Sartorius AG (Göttingen, BRD) (Abbildung 15) mit einem cut-off von 20.000 D zum Einsatz.

Die Einheit besteht aus einer äußeren Hülle, welche die Probe aufnimmt und einem inneren membranhaltigen Schwimmer, in den das Ultrafiltrat gelangt. In das äußere Gefäß wird die gesamte Probe vorgelegt und im Anschluss daran der Schwimmer so eingesetzt, dass er die Flüssigkeitsoberfläche berührt und von dieser benetzt werden kann. Durch Zentrifugation wird ein hydrostatischer Druck aufgebaut. Membranpermeable Substanzen, freier, ungebundener Anteil an Substanz und Lösungsmittel, werden so aus dem Probengefäß durch die Membran gezwungen. In Folge der Zentrifugalkraft werden außerdem eventuell vorhandene größere Partikel entgegengesetzt zur Filtrationsrichtung von der Membran weg transportiert. Die Membran wird frei gehalten und es können hohe Filtrationsraten erzielt werden. Wenn in der inneren und äußeren Kammer die Flüssigkeitsstände gleich sind, kommt die Filtration zum Stillstand und das Ultrafiltrat kann mittels Pipette entnommen werden.



**Abbildung 15** Centrisart® I Filtereinheit Fa. Sartorius

Der freie Arzneistoffanteil im Ultrafiltrat wurde mit n-Hexan ausgeschüttelt und nach Befreiung vom Lösungsmittel mit Hilfe der HPLC nach DAC bestimmt.

Als Ergebnis resultierte eine hohe PEB (99%) für die Derivate mit Morpholin als Basenkomponente (Tabelle 21). Die Diethanolamin-Analoga sind im Vergleich dazu durch eine geringere PEB (ca. 90%) gekennzeichnet. Diese hydrophileren Substanzen werden also weniger an die Eiweiße des Blutplasmas gebunden. Da nur freier, ungebundener

Arzneistoff wirken kann, stehen diese Derivate schneller zur Verfügung, werden aber auch schneller aus dem Organismus und damit dem Ort ihrer Wirkung durch Metabolisierung und Elimination entfernt.

| Code  | PEB - Bindung |
|---|---------------|
| <b>A: Morpholin als Basenkomponente</b>     |               |
| OE 5000                                     | 99,2 %        |
| OE 500                                      | 99,3 %        |
| Fomocain                                    | 99,0 %        |
| OE 1000                                     | 99,0 %        |
| <b>B: Diethanolamin als Basenkomponente</b> |               |
| OE 8000                                     | 87,7 %        |
| OE 6000                                     | 88,1 %        |
| OE 7000                                     | 87,1 %        |
| OE 9000                                     | 91,6 %        |

**Tabelle 21** Plasmaeiweißbindung der untersuchten Derivate

### 3.2.2.2. In vitro Metabolisierung

Arzneistoffe werden vom menschlichen Organismus vorwiegend renal ausgeschieden. Lipophile Substanzen werden dabei, bedingt durch die Rückresorption in den Nierentubuli, nur langsam eliminiert. Sie können lange im Körper verbleiben und sich u.a. im Fettgewebe anreichern. Diese lipophilen Xenobiotika können durch verschiedene Biotransformationsreaktionen in hydrophilere, leichter eliminierbare Stoffe umgewandelt werden. Die Umwandlungsprozesse erfolgen vorwiegend in der Leber und untergeordnet in Darm, Milz, Lunge oder im Blut. Eine besondere Bedeutung besitzt hierbei das Cytochrom P-450 System. Verschiedene Isoenzyme dieser Enzymfamilie der Monooxygenasen katalysieren oxidative Biotransformationsreaktionen, wie u.a. aliphatische und aromatische Hydroxylierungen, Epoxidierung von Doppelbindungen oder Desalkylierung von N-, O- und S-Alkylverbindungen. Lokalisiert sind diese Enzyme vorwiegend in der Leber. Durch fraktionierte Zentrifugation von Leberzellhomogenaten kann die Mikrosomenfraktion (Fragmente des endoplasmatischen Retikulums und Ribosomen) mit daran gebundenen mikrosomalen Enzymen gewonnen werden.

Die für die Durchführung der Versuche benötigten Mikrosomen wurden nach Abbildung 31 (Seite 95) aus einer frischen Rinderleber gewonnen und vor der Verwendung auf den Gehalt an Proteinen und Cytochrom P-450 bzw. Cytochrom b<sub>5</sub> getestet. Nach Inkubation und Elution über Extrelut<sup>®</sup> NT 20 Säulen (Fa. Merck, Darmstadt) wurden alle Proben vom Solvens befreit. Anschließend wurden die Rückstände mit einem geeigneten Fließmittel

aufgenommen und mit Hilfe der HPLC charakterisiert. Neben der quantitativen Beurteilung (Abnahme der Substratkonzentration) erfolgte unter Verwendung der HPLC-MS (ESI) Methode die qualitative Beurteilung der entstandenen Metabolite.

Ziel der Versuche war es, Aussagen über den oxidativen Abbau der z.T. sehr lipophilen Fomocain-Derivate zu treffen. Dabei sollten der Umfang der Metabolisierung und die entstehenden Produkte soweit wie möglich charakterisiert werden.

Alle acht untersuchten Verbindungen wurden durch Cytochrom P-450 abgebaut. Nach einer Inkubationszeit von 30 min lag der Abbau unter den genannten experimentellen Bedingungen zwischen 2% und 7%. Die Substanzen mit Morpholin als Basenkomponente waren einem geringeren enzymatischen Abbau unterworfen. Die Derivate mit längerer Alkylkette im Molekül wurden ebenfalls in deutlich geringerem Umfang metabolisiert. Trotz ausreichend hohem Gehalt an Cytochrom P-450 war die gefundene Metabolisierungsrate gering. Dies könnte entweder bedeuten, dass andere Enzyme am Abbau der Substanzen beteiligt sind oder eine zu kurze Inkubationszeit gewählt wurde.

Weiterhin war für alle geprüften Verbindungen ein hydrophileres, hydroxyliertes Produkt nachweisbar. Die Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen exemplarisch das Massenspektrum von OE 7000 bzw. Fomocain nach der Inkubation.

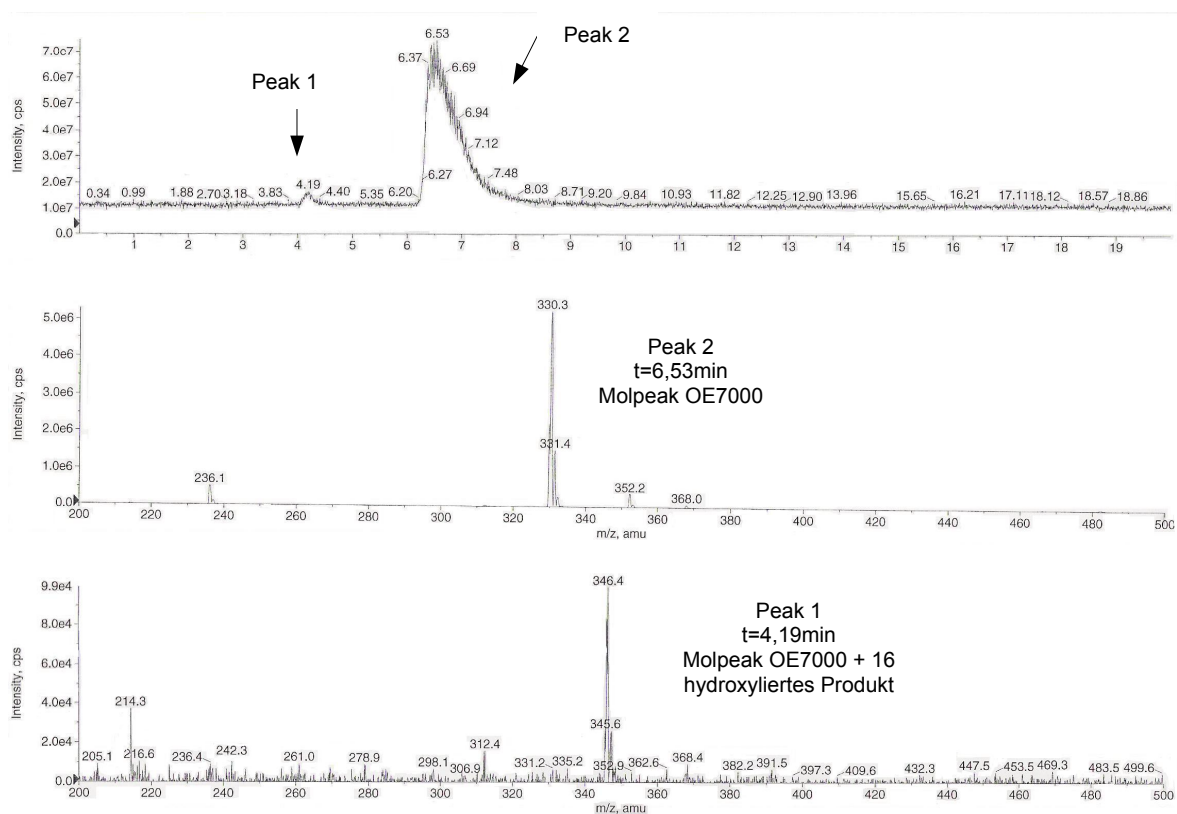
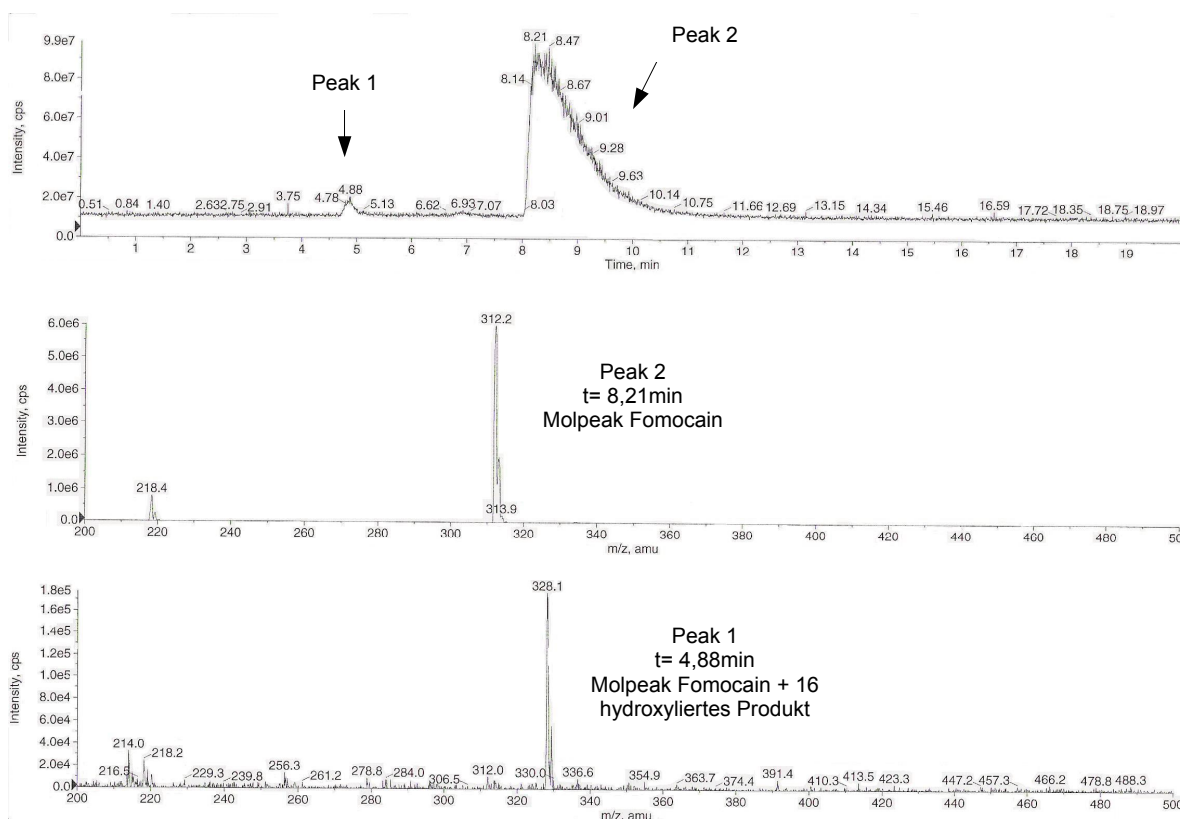


Abbildung 16 OE 7000 - HPLC-MS ESI Spektrometrie nach Inkubation im Rinderleberzellhomogenat





**Abbildung 17** Fomocain - HPLC-MS ESI Spektrometrie nach Inkubation im Rinderleberzellhomogenat

Alle acht inkubierten Derivate zeigten gleiches Verhalten. Es war lediglich ein weiteres Produkt neben dem Ausgangsstoff nachweisbar. Auf Grund der Massendifferenz und nach dem allgemeinen Reaktionsmechanismus der Monooxygenasen wurde geschlossen, dass es sich um ein einfach hydroxyliertes Produkt handelt. Die Hydroxylgruppe wird dabei, wie in vorangegangenen Untersuchungen am Fomocain gezeigt worden ist, in 4-Stellung der Phenolkomponente eingeführt. Möglich wäre ebenfalls die Entstehung des N-Oxids, das sich durch die gleiche molare Masse auszeichnen würde.

### 3.2.3. Die ausgewählten Derivate OE 7000 und OE 9000

Nicht alle zur Verfügung stehenden Derivate des Fomocain konnten einer genaueren Prüfung hinsichtlich der möglichen Eignung als Ersatz für dieses Lokalanästhetikum unterzogen werden. Aufgrund der Ergebnisse der umfangreichen physikalisch-chemischen Untersuchungen beschränkte ich mich im Rahmen der Dissertation auf die Derivate OE 7000 und OE 9000, da diese durch die angestrebten günstigen Parameter auffielen. Beide Substanzen kamen als Hydrochloride zum Einsatz. Es wurden neben den wässrigen Lösungen in Analogie zum Fomocain auch die EV von OE 7000 und OE 9000 in 2-HP-β-

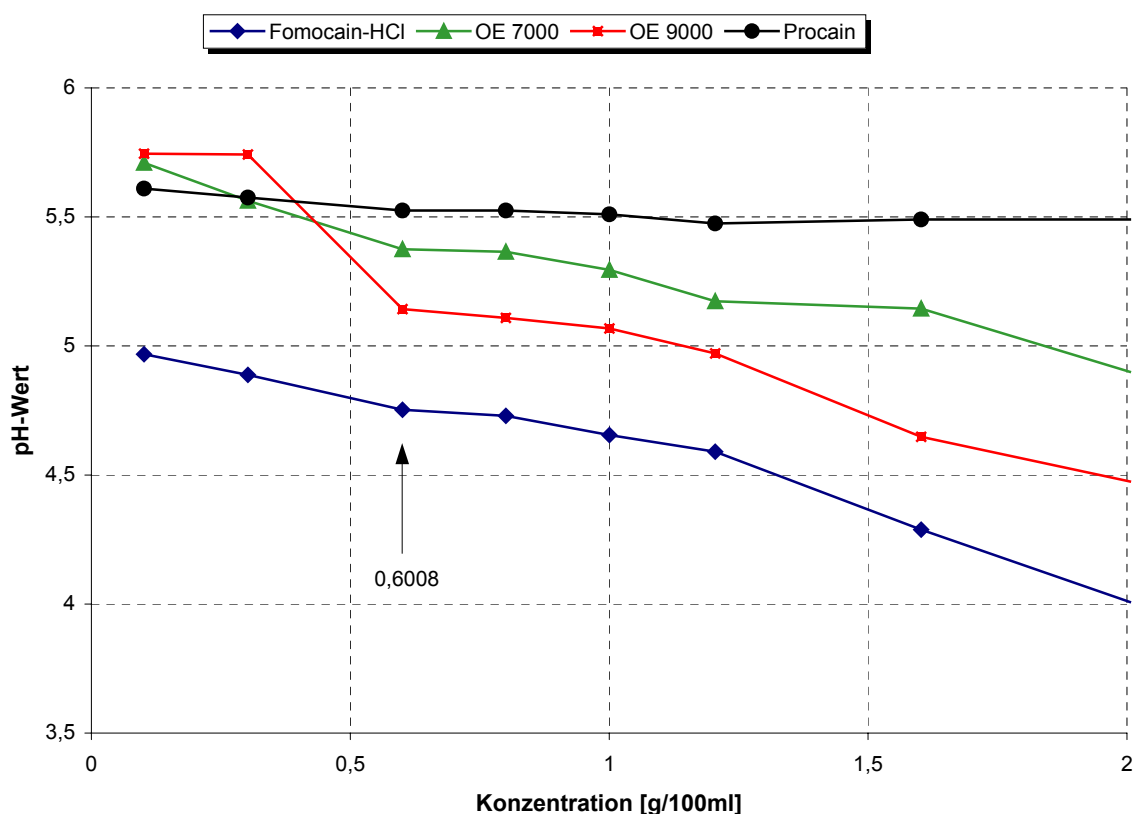
CD getestet. Neben einer Charakterisierung der Stabilität der Lösungen, des enzymatischen Abbaus und der Mizellisierungstendenz erfolgte ebenso eine pharmakologisch-toxikologische Prüfung. Zur besseren Vergleichbarkeit oder wenn noch keine Daten dazu erhoben waren, wurde die Stammsubstanz Fomocain in die Bestimmungen mit einbezogen.

#### 3.2.3.1. Bestimmung der CMC durch konzentrationsabhängige pH-Wert-Messung

Bedingt durch hydrophile und lipophile Strukturbausteine besitzen Fomocain und seine Derivate amphiphilen Charakter. Sie sind in der Lage in wässriger Lösung Mizellen zu bilden, d.h. sich so auszurichten, dass sich Strukturen gleicher chemischer Eigenschaften zusammenlagern. Dabei entstehen, in Abhängigkeit von der Konzentration des Mizellbildners, Molekülaggregate verschiedener Zusammensetzungen. Die sogenannte kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) ist der Punkt, an dem die Bildung der Aggregate erfolgt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese für jede mizellbildende Substanz spezifische Konzentration zu bestimmen.

In der vorliegenden Dissertation wurde von mir die Methode zur Bestimmung der CMC durch konzentrationsabhängige pH-Wert-Messung nach Thoma<sup>52</sup> durchgeführt. Dazu wurde von allen Substanzen (Fomocain-HCl, OE 7000, OE 9000 und Procain) eine identische Konzentrationsreihe angefertigt. Auf Grund der zu erwartenden Kristallisationstendenz einiger Proben erfolgte die sofortige Bestimmung des pH-Wertes nach der Herstellung der Prüflösung und nach ca. 10 min Begasung mit Stickstoff. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Aufnahme aller Daten wurden diese zur Auswertung in ein pH-Wert-Zeit-Diagramm überführt. Definitionsgemäß ist die CMC erreicht, wenn der Kurvenverlauf einen deutlichen „Knick“ aufweist.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 18 zusammengefasst. Für die Vergleichssubstanz Procain konnte keine CMC definiert werden. Der Kurvenverlauf ist geradlinig. Die CMC von Fomocain und seinen Derivaten OE 7000 und OE 9000 wurde mittels dieser Methode mit 0,6008g/100ml (0,6%) bestimmt. Der Wert kann nur als Näherungswert betrachtet werden bzw. als Beweis dafür dienen, dass alle neuen Derivate als Mizellbildner zu betrachten sind. Näherungswert deshalb, weil die Versuchsdurchführung problematisch war. Instabile Lösungen und Schaumbildung erschwerten die exakte Bestimmung.

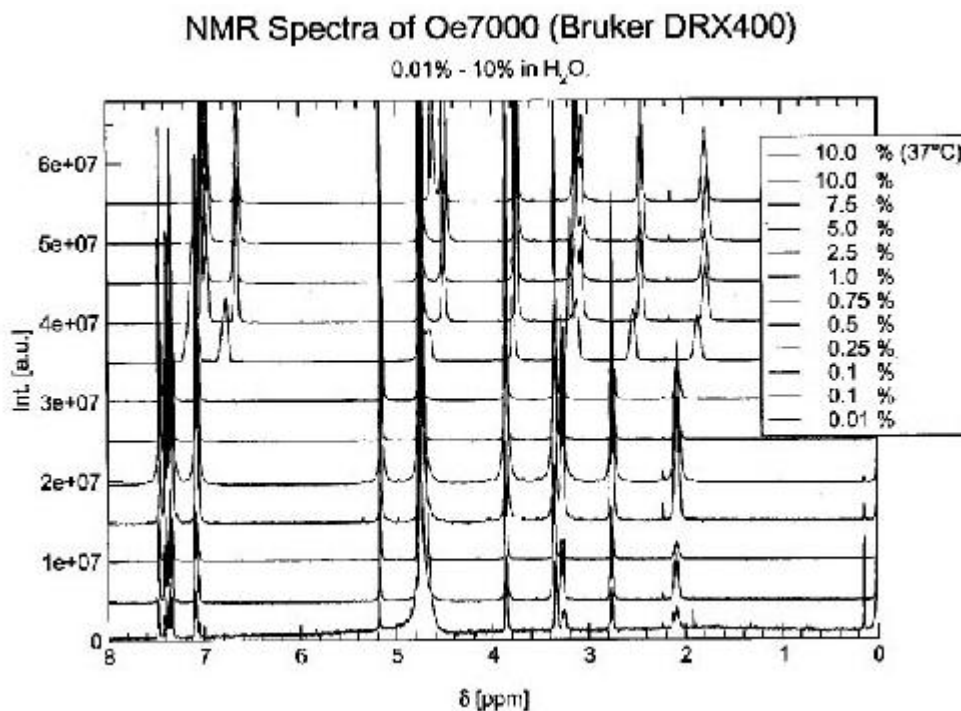


**Abbildung 18** Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration von Fomocain, OE 7000, OE 9000 und Procain durch konzentrationsabhängige pH-Wert-Messung

Alle neuen Derivate und die Stammsubstanz Fomocain sind Mizellbildner. Die Größe der sich bildenden Aggregate entscheidet über die Konsequenz dieses Befundes. Im Normalfall ist die Mizellgröße gleich der doppelten Molekülgröße. Für meine Substanzen entspräche das ca. 4nm und damit einer Größe, die bedenkenlos anwendbar wäre.

Für die Substanz OE 7000 wurden weitere Versuche angestrengt, die exakte Mizellgröße und die entsprechenden Konzentrationen zu ermitteln. Mit den Methoden der Lichtstreuung, des Gefrierbruchs und der NMR gelang es, das Verhalten von OE 7000 in Wasser zu analysieren. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von 0,01% bis 10% untersucht. Die Befunde der drei genutzten Methoden waren dabei deckungsgleich. Während in den kleinen Konzentrationsbereichen nur eine Partikelgröße gefunden wurde, waren im Bereich zwischen 0,5 und 2,5% zwei verschiedene Fraktionen nachweisbar. Die Tendenz zur Ausbildung größerer Assoziate stieg dabei in gleichem Maße wie die Konzentration. Der Gehalt von 2,5% ist im NMR durch vollständige Signalentkopplung und größte Verschiebung gekennzeichnet. Die Zubereitungen zwischen 5 bis 10% wiesen wieder nur Teilchen der Größe der Monomere (2-3nm) auf. Die CMC, welche mit Hilfe

der Potentiometrie ermittelt wurde, lag bei 0,6008g/100ml. Eine Assoziatbildung ist demzufolge gegeben. Die Befunde sind allerdings schlecht erklärbar und auf Grund der Stabilität der Zubereitungen und der verhältnismäßig kleinen Teilchengrößen von geringer praktischer Relevanz.



**Abbildung 19** NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Assoziatbildung von OE 7000 in wässriger Lösung

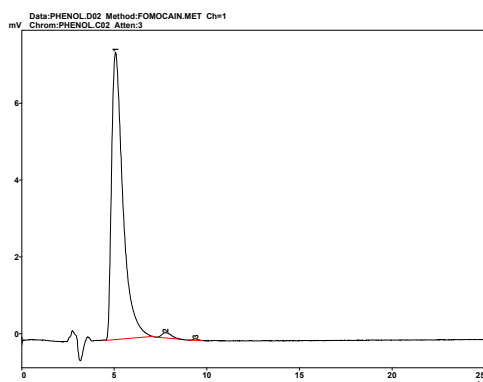
### 3.2.3.2. Bestimmung der Stabilität der Lösungen

Unter 3.2.1.1. erfolgte die Bestimmung der Löslichkeit nach EuAB in Aqua dest. und Phosphat-Puffer (EuAB, pH 7,4). Für OE 7000 und OE 9000 wurde für beide Lösungsmittel ein leicht lösliches Verhalten gefunden. Innerhalb dieser Versuchsreihe sollte die Stabilität (RT, Lichtschutz) verschieden konzentrierter Lösungen der beiden Derivate getestet werden. Weiterhin galt es zu klären, ob eine maximale Löslichkeit im Sinne einer Sättigungskonzentration definiert werden kann.

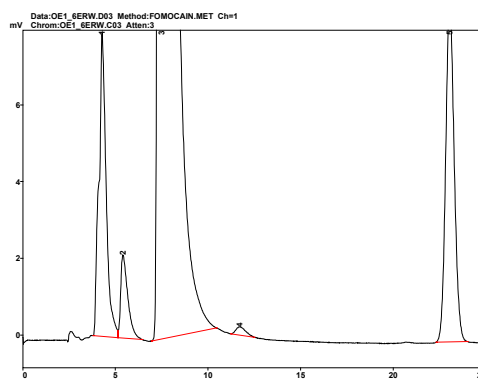
Für beide Derivate wurde eine vierstufige Konzentrationsreihe in Aqua dest. angefertigt (0,1%, 0,5%, 1,0%, 2%) und über einen Zeitraum von 100 d gelagert und beobachtet. Von OE 7000 wurden weiterhin zwei weitere Probenreihen gleicher, o.g. Konzentrationen zubereitet. Die Proben wurden vor der Lagerung 1 h bei 50°C erwärmt oder dampfsterilisiert (125°C, 15 min). Es erfolgte in kontinuierlichen Abständen (sofort, 72 h, 120 h, 240h, 480 h, 1200 h, 2400 h) eine visuelle Beurteilung der Proben und eine HPLC-

Gehaltsbestimmung. Alle Proben wurden vor der Gehaltsbestimmung durch Filtration (0,2µm) von kristallinen Produkten und Schwebeteilchen befreit.

Sämtliche Konzentrationsansätze des Fomocain-Analogons OE 7000 waren über den gesamten Zeitraum stabil. Über den Zeitraum der Beobachtung traten weiterhin weder Verfärbung der Lösung noch eine pH-Verschiebung ein. Es erfolgte weder Präzipitation der Base, wie sie von der Stammsubstanz bekannt ist, noch eine Bildung von Nebenprodukten. Letzteres ist für Fomocain-HCl in leicht saurer Lösung nach Wärmeeinfluss beschrieben. Von mir wurde diese Beobachtung für OE 7000 experimentell (pH 1,6, 15min 125°C) nachvollzogen (Abbildungen 20 und 21). Durch Protonen und begünstigt durch Wärme tritt Etherspaltung ein.



**Abbildung 21** HPLC-Chromatogramm nach Etherspaltung (Vergleichssubstanz)



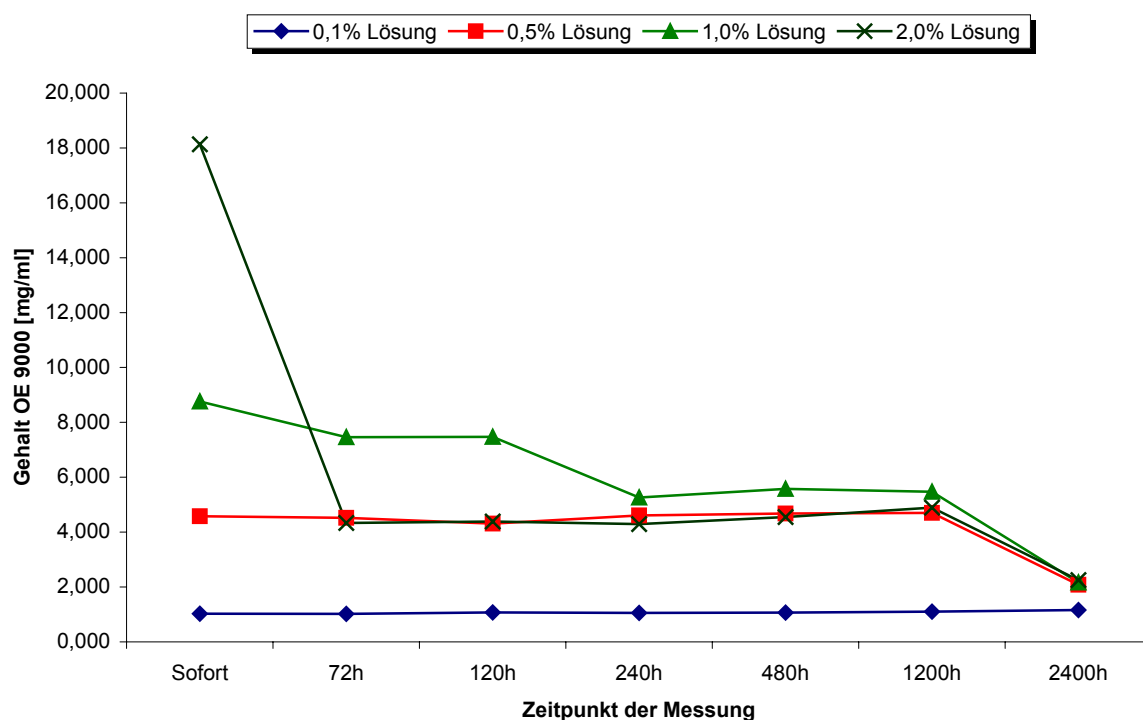
**Abbildung 20** HPLC-Chromatogramm von OE 7000 bei pH 1,6 und nach Erwärmung

Im Anschluss an die beschriebenen Versuche wurden Proben jeder Versuchsreihe für ein Jahr gelagert. Auch über diesen Zeitraum waren alle Lösungen vollständig stabil (HPLC) und daher anwendbar.

Die zweite untersuchte Substanz OE 9000 war durch deutliche geringere Stabilität gekennzeichnet (Abbildung 22). Lediglich eine 0,1%ige Lösung war über den kompletten Beobachtungszeitraum ohne Veränderungen zu bewerten. Die 0,5%ige Zubereitung war 50 d stabil. Nach 100 d sinkt der Gehalt auf 0,2%. Die höher konzentrierten Lösungen zeigten Stabilität für 1 d. Danach erfolgte Präzipitation der Base und damit verbunden ein Gehaltsverlust in der wässrigen Lösung. Beide Zubereitungen wiesen für 50 d einen Gehalt von ca. 0,5% auf. Danach erfolgt ein weiteres Absinken auf 0,2%.

Eine zweiprozentige Lösung von OE 9000 ist somit ohne weitere Zusätze zur wässrigen Lösung nur kurzzeitig stabil. Eine Lagerung bei RT ist nicht möglich, da die Base unter den genannten Bedingungen ähnlich dem Fomocain ausfällt. Ein Grund dafür ist die höhere Lipophilie der Substanz im Vergleich zum OE 7000. Um dennoch eine wässrige

Lösung einsetzen zu können, wäre die Produktion eines Lyophilisats und sofortige Applikation der frisch zubereiteten Lösung denkbar.



**Abbildung 22** Stabilität der wässrigen OE 9000 Zubereitung in unterschiedlichen Konzentrationen

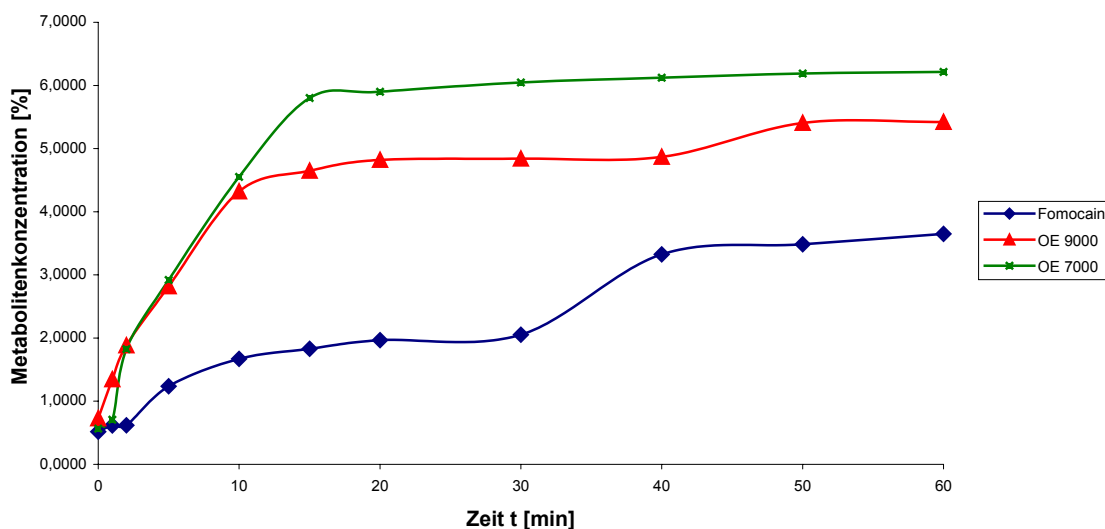
Eine maximale Löslichkeit im Sinne einer Sättigungskonzentration war für beide Substanzen nicht bestimmbar.

### 3.2.3.3. Enzymatischer Abbau der Substanzen (In-vitro Kinetik)

Unter 3.2.2.1. (Seite 46) wurde die In-vitro Metabolisierung der Derivate des Fomocain untersucht. Analog dieser Versuchsdurchführung wurde der enzymatische Abbau von OE 7000, OE 9000 und Fomocain getestet. Bei den Inkubationen wurde die Konzentrationsabnahme der eingesetzten Substanzen gegen die Zeit gemessen. Die Dauer der Inkubation wurde in dieser Versuchsreihe auf 60 min erhöht. Nach Elution und Aufarbeitung der inkubierten Proben erfolgte eine quantitative Gehaltsbestimmung mit Hilfe der HPLC.

Ziel war es, Unterschiede im enzymatischen Abbau der drei chemisch verschiedenen Derivate festzustellen und vergleichende Aussagen hinsichtlich ihrer Metabolisierungsrate und ihrer Verweildauer im menschlichen Organismus treffen zu können.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 zusammengefasst. Alle drei Derivate wurden durch die verwendeten Mikrosomen aus Rinderleber nur langsam abgebaut. Nach 60 min waren lediglich 3% Fomocain, 5% OE 9000 und 6% OE 7000 metabolisiert. Es ist weiterhin ein steady state zu erkennen, was auf eine „Erschöpfung“ der Enzyme hindeutet. Trotzdem ist zu erkennen, dass die Metabolisierungsrate mit steigender Hydrophilie der Substanz zunimmt.



**Abbildung 23** Zeitlicher Verlauf des enzymatischen Abbaus von Fomocain, OE 7000 und OE 9000

Fomocain wird von allen drei untersuchten Derivaten am langsamsten enzymatisch abgebaut. Dies könnte in einer geringeren Affinität zum Enzymsystem oder einer hohen PEB und damit geringeren Menge an freier Substanz begründet sein. Die beiden hydrophileren Verbindungen OE 7000 und OE 9000 werden deutlich besser durch Cytochrom-P 450 umgesetzt und damit auch schneller ausgeschieden.

#### 3.2.3.4. Zubereitung der Substanzen in 2-HP- $\beta$ -CD

Eine Zubereitung von Fomocain in 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD war das Ergebnis einer Vielzahl von Versuchen, um das schwer wasserlösliche Morphin-Derivat in hoher Konzentration in Lösung zu bringen. Die beiden leicht wasserlöslichen Substanzen OE 7000 und OE 9000 wurden demzufolge ebenfalls als eine Zubereitung von jeweils 4% Substanz in 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD getestet. Dabei sollte untersucht werden, ob diese neue

Einschlussverbindung die Eigenschaften der beiden Diethanolamin-Derivate verändert, z.B. eine Stabilitätserhöhung der OE 9000-Lösung ermöglicht.

Folgende Parameter wurden für beide Substanzen getestet und ausgewertet:

1. Bindungskonstanten und Arzneistoff-Hilfsstoff-Verhältnis (vgl. 3.1.3.2., Seite 31)
2. Stabilität der Zubereitungen (vgl. 3.1.3.3., Seite 35)
3. Einfluss des 2-HP- $\beta$ -CD auf die PEB (vgl. 3.1.3.4., Seite 36)

Theoretische Vorbetrachtungen und praktische Durchführungen sind den entsprechend vermerkten Abschnitten des Fomocain zu entnehmen.

Sowohl von OE 7000 als auch von OE 9000 ließ sich problemlos eine 4%ige Lösung in 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD herstellen. Durch Zugabe der jeweiligen Substanz zum cyclodextrinhaltigen Medium und Rühren entstand eine klare, leicht gelbliche, viskose Lösung. Vor der weiteren Verwendung wurden die Proben filtriert (0,2 $\mu$ m), um diese von Schwebstoffen zu befreien.

Die mit Hilfe der Kapillarelektrophorese (CE) und Titration ermittelten Bindungskonstanten in der Zubereitung zeigen keine wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Stammsubstanz (Tabelle 22). Sie sind zwar geringfügig höher, aber trotzdem ist die Bindung als schwach zu bezeichnen. Das Arzneistoff-Hilfsstoff-Verhältnis wurde ebenfalls mit 1:1 ermittelt.

|                  | <b>Fomocain</b>       | <b>OE 7000</b>         | <b>OE 9000</b>         |
|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Titration</b> | 1360 M <sup>-1</sup>  | 1570 M <sup>-1</sup>   | 2270 M <sup>-1</sup>   |
| <b>CE</b>        | 638,5 M <sup>-1</sup> | 1136,2 M <sup>-1</sup> | 1269,2 M <sup>-1</sup> |

**Tabelle 22** Verschieden ermittelte Bindungskonstanten für Fomocain, OE 7000 und OE 9000

OE 9000 wies die größte Affinität der drei untersuchten Substanzen zum CD auf. Für keine der Verbindungen sind jedoch verzögerte Wirkungseintritte in Folge von Freisetzungsschwierigkeiten aus dem CD-Komplex zu erwarten.

Die Zubereitungen von OE 7000 und OE 9000 in 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD erwiesen sich nach 100 d Lagerung (RT, Lichtschutz) hinsichtlich des Wirkstoffgehaltes als stabil. Nach diesem Beobachtungszeitraum betrug die Wiederfindungsrate 100%, bestimmt mit HPLC. Präzipitation der freien Base und damit Wirkstoffverlust, wie bei der wässrigen OE 9000 Lösung, trat nicht ein. Jedoch waren die Proben nach geraumer Zeit mikrobiell befallen. Ein Pilzmycel überzog die Rückstellmuster. Vorausgegangene Wärmebehandlung (1 h,



50°C oder Dampfsterilisation (15 min, 125°C) konnten dieses Phänomen verhindern. Der Wärmeeinfluss wurde von den Substanzen ohne Auswirkungen toleriert. Es traten keine Veränderungen im Gehalt auf, es entstanden keine nachweisbaren Nebenprodukte. Die Möglichkeit der Lyophilisatbildung wurde auch für diese Derivate getestet. Die durch Gefriertrocknung entstandenen Produkte waren weiß und pulvrig. Sie ließen sich problemlos durch Zugabe von Lösungsmittel zur ursprünglichen Lösung rekonstituieren. Durch die Bildung einer EV in 2-HP- $\beta$ -CD bleiben die PEB von OE 7000 und OE 9000 nahezu unbeeinflusst. Während bei OE 7000 die PEB von 87,1% auf 90,6% stieg, sank sie beim längerkettigen Derivat OE 9000 von 91,6% auf 85,5%. Die Steigerungs- bzw. Reduktionsraten sind als gering zu bewerten und deuten nicht auf eine signifikante Beeinflussung durch die Verwendung des CD hin. Die Komplexstabilität zwischen dem Arzneistoff und den Plasmaproteinen muss demzufolge größer sein als die zwischen 2-HP- $\beta$ -CD und den Substanzen. Die ermittelten geringen Komplexbildungskonstanten (Tabelle 22) ließen dies schon vermuten. Die Arzneistoffe wurden leicht aus dem Komplex mit dem CD abgegeben und konnten an die Proteine des Plasmas gebunden werden.

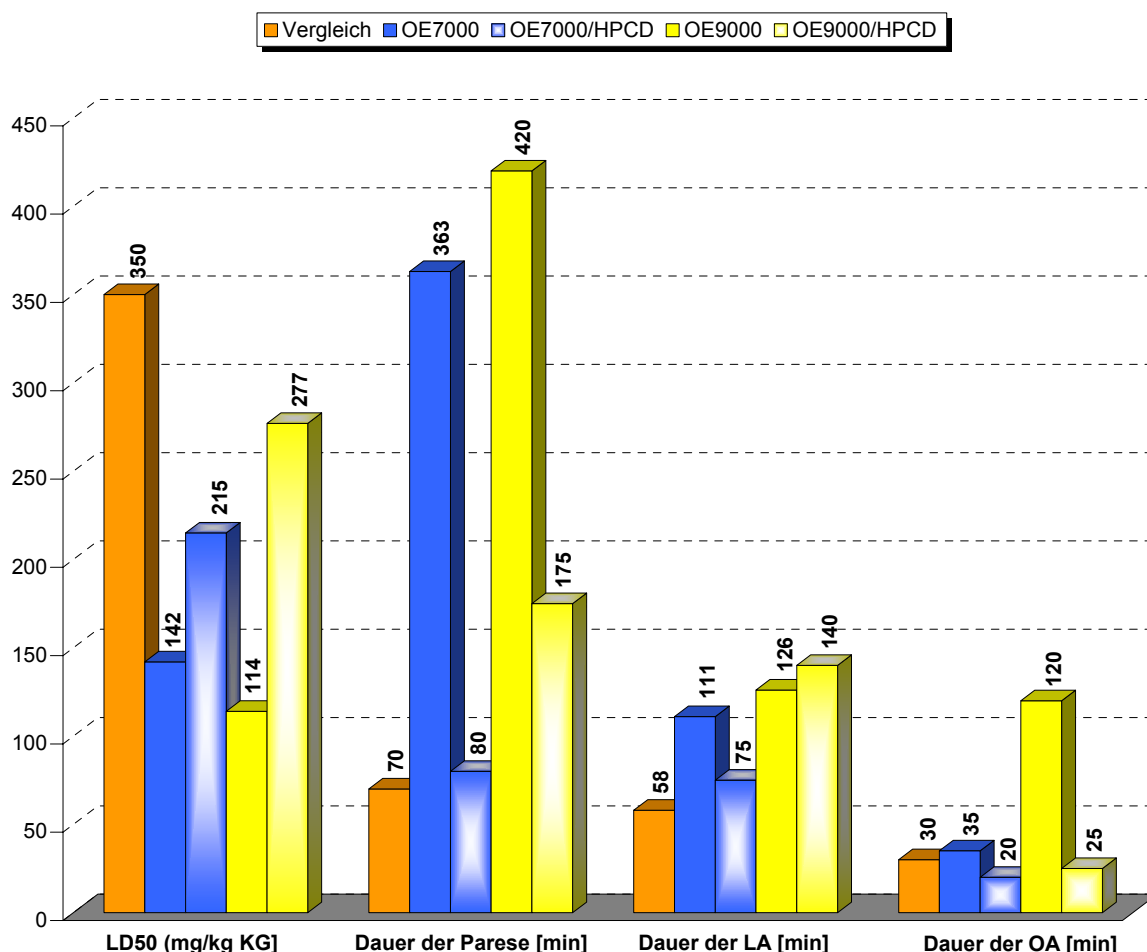
### 3.2.3.5. Pharmakologisch-toxikologische Parameter

Die zahlreichen neuen Derivate des Fomocain wurden im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Fleck vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena pharmakologisch geprüft. Die Ergebnisse sind bereits veröffentlicht<sup>50, 60</sup> worden bzw. wurden im Rahmen einer Dissertation<sup>61</sup> vorgestellt.

Unter 3.1.3.5. (Seite 37) sind die Versuche mit Fomocain beschrieben worden. Für OE 7000, OE 9000 und deren 2-HP- $\beta$ -CD-Zubereitungen wurden diese in vollständiger Analogie durchgeführt. Als Referenzsubstanzen dienten Procain (Leitungsanästhesie) und Tetracain. (Oberflächenanästhesie) Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 zusammengefasst. OE 9000 war im Vergleich zu OE 7000 durch ungünstigere toxikologische Parameter gekennzeichnet. Sowohl der LD<sub>50</sub>-Wert (114 mg/kg KG vs. 142 mg/kg KG) als auch die Paresedauer (420 min vs. 363 min) waren signifikant schlechter. Dagegen zeigte die längerkettige Substanz eine stärker ausgeprägte Leitungsanästhesie (126 min vs. 111 min) und eine deutlich erhöhte Oberflächenanästhesie (120 min vs. 35 min).

Im Gegensatz zum Fomocain bedeutete der Zusatz von 2-HP- $\beta$ -CD keinen Vorteil für die beiden besser wasserlöslichen Derivate. Die toxikologischen Daten wurden zwar verbessert, doch die pharmakologischen Parameter blieben annähernd gleich oder

verschoben sich in weniger wirksame Bereiche. Ebenso blieben auch bei der Verwendung von OE 7000 und OE 9000 als EV die genannten Unterschiede der wässrigen Lösungen in Pharmakologie und Toxikologie zwischen den beiden Substanzen erhalten.



**Abbildung 24** Vergleich der Pharmakologisch-toxikologischen Parameter von OE 7000, OE 9000 und ihrer 2-HP- $\beta$ -CD-Zubereitungen in 2%iger Lösung

Abschließend darf festgehalten werden, dass die sehr gut wasserlöslichen Substanzen OE 7000 und OE 9000 denkbare Alternativen zur Stammsubstanz Fomocain darstellen. Dabei ist OE 7000 die stabilere Substanz, die auch in rein wässriger Lösung verwendet werden könnte. OE 9000 bedürfte zur Stabilitätserhöhung eines Zusatzes, z.B. 2-HP- $\beta$ -CD und ist durch günstigere pharmakologisch-toxikologische Parameter gekennzeichnet.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1. Experimente zur Verbesserung der Löslichkeit der Fomocain-Base

#### 4.1.1. Salzbildung

Die einzige relativ leicht wasserlösliche Verbindung der Fomocain-Base ist das Hydrochlorid. Der pH-Wert einer Lösung von 3% Fomocain-HCl liegt bei 3,5. Wird der pH-Wert auf gewebeverträgliche Werte angehoben, beginnt ab pH 5,70 die Präzipitation der Base. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die wässrigen Lösungen von Fomocain-HCl bei ihrer Lagerung die Base an der Gefäßwand abscheiden. Durch Variation der Säurekomponente wurde ein Salz angestrebt, dass auch bei Änderung der Pufferkapazität klare, stabile und hochprozentige Zubereitungen gewährleistete.

##### 4.1.1.1. Geräte

###### 1. HPLC

siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen A

###### 2. pH-Wert

siehe 4.6.1. (Seite 96)

##### 4.1.1.2. Materialien

Die verwendeten Säuren (Tabelle 23) wurden von der Fa. Merck (Darmstadt, BRD) bezogen. Sie besaßen Analysenzertifikate und hatten den vorgeschriebenen Gehalt. Die Fomocain-Base stammte aus eigener Herstellung im Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der FSU Jena. Sie war HPLC-rein, hatte einen Gehalt von 99,8% und zeigte einen Schmelzpunkt von 57°C.

Die Filtration aller Proben erfolgte mittels Rotilabo®-Spritzenfilter, 0,22µm, PVDF (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD).

#### 4.1.1.3. Methoden

Die Verwendung der Säuren erfolgte in Abhängigkeit von den Säurefunktionen des Moleküls. Sie wurden in äquimolarer, halbmolarer oder drittmolarer Konzentration zur Fomocain-Base eingesetzt.

| Anorganische Säuren  | Organische Säuren       | Aminosäuren      |
|----------------------|-------------------------|------------------|
| Phosphorsäure        | Ameisensäure            | L-Arginin        |
| Bromwasserstoffsäure | Essigsäure              | DL-Lysin         |
|                      | Chloressigsäure         | L-Glutamin       |
|                      | Benzolsulfonsäure       | L-Asapragin      |
|                      | Toluolsulfonsäure       | L-Threonin       |
|                      | Naphthalindisulfonsäure | L-Cystein        |
|                      | Malonsäure              | L-Serin          |
|                      | Maleinsäure             | L-Asparaginsäure |
|                      | Fumarsäure              | L-Glutaminsäure  |
|                      | Weinsäure               |                  |
|                      | Äpfelsäure              |                  |
|                      | Citronensäure           |                  |
|                      | Bernsteinsäure          |                  |
|                      | Milchsäure              |                  |
|                      | Gluconsäure             |                  |
|                      | Sorbinsäure             |                  |
|                      | Ascorbinsäure           |                  |

**Tabelle 23** Verwendete Säuren zur Salzbildung

Die Einwaage der Base wurde so gewählt, dass für den Fall einer vollständigen Löslichkeit eine 1%ige Lösung entstand. Entsprechend dazu erfolgte der Zusatz an Säure. Beide Substanzen wurden miteinander verrieben und mit Aqua dest. versetzt und 24 h gerührt. Nach pH-Wert Anpassung mit 0,1N- oder 1N-NaOH erfolgte eine visuelle Begutachtung der Proben. Durch Filtration wurden die Ansätze für die HPLC-Gehaltsbestimmung vorbereitet. Alle Proben wurden nach Zusatz von 100µl Internem Standard, 1-Chlor-3-(4-carboxyphenyl)-propan, unverdünnt zu je 10µl injiziert.

#### 4.1.2. Bildung von Mischmizellen

Fomocain hat bedingt durch seine lipophilen und hydrophilen Strukturbausteine amphiphilen Charakter. Das Lokalanästhetikum ist also in der Lage, Mizellen zu bilden. Durch verschiedene Kombinationen von Fomocain-Base und Fomocain-HCl wurden

sogenannte Mischmizellen angestrebt, die eine bessere Wasserlöslichkeit der Substanz zur Folge haben konnten.

#### 4.1.2.1. Geräte

##### 1. HPLC

siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen A

##### 2. pH-Wert

siehe 4.6.1. (Seite 96)

#### 4.1.2.2. Materialien

Die benötigten Lösungsmittel stammten von der Fa. Merck (Darmstadt, BRD), p.A. Qualität. Fomocain-Base und Fomocain-HCl basierten auf eigener Herstellung im Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der FSU Jena. Sie waren HPLC-rein und hatte einen Gehalt von 99,8% bzw. 100,1%.

Die Filtration aller Proben erfolgte mittels Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, 0,22µm, PVDF (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD).

#### 4.1.2.3. Methoden

##### 4.1.2.3.1. Feststoffverreibungen in unterschiedlichen Verhältnissen

Die Anfertigung der Feststoffverreibungen von Fomocain-Base und Fomocain-HCl erfolgte unter der Maßgabe, dass beim vollständigen Auflösen der Substanzen eine 2%ige Lösung von Fomocain berechnet auf die Base entsteht (Tabelle 24). Es wurden die Verhältnisse 1:1, 2:1 und 1:2 gewählt. Als Lösungsmittel kamen jeweils Aqua dest. (pH 5,8), Isotonische NaCl-Lösung (NaCl 0,9% in Aqua dest., Merck, Darmstadt, BRD) und Ringer-Lösung aus Ringer-Tabletten (Merck, Darmstadt, BRD) zum Einsatz.

|               | 1:1     | 1:2     | 2:1     |
|---------------|---------|---------|---------|
| Fomocain-Base | 311,4mg | 311,4mg | 622,8mg |
| Fomocain-HCl  | 347,4mg | 694,8mg | 347,4mg |

**Tabelle 24** Einwaagen für die Feststoffverreibungen

Nach Zugabe des Lösungsmittels und 24 h Rühren wurden sämtliche Proben zunächst visuell beurteilt und anschließend filtriert. 900µl Filtrat und 100µl Interner Standard wurden gemischt und mittels HPLC auf den Gehalt an Fomocain getestet.

#### 4.1.2.3.2. Feststoffverreibungen im Verhältnis 1:1 und Umkristallisation aus organischen Lösungsmitteln

Für die Versuche wurde die unter 4.1.2.3.1. (Seite 62) angefertigte Feststoffverreibung im Verhältnis 1:1 verwendet. Als organische Solventien kamen Acetonitril, Aceton, Methanol und THF zum Einsatz. Nach abgeschlossenem Lösevorgang wurden die Ansätze im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und weitere 24 h über Phosphorpentoxid getrocknet. Die getrockneten Produkte wurden in Aqua dest., Isotonischer NaCl-Lösung oder Ringer-Lösung aus Ringer-Tabletten (Merck, Darmstadt, BRD) aufgenommen und 24 h gerührt. Nach visueller Beurteilung erfolgte die Filtration und die HPLC-Gehaltsbestimmung (900µl Filtrat und 100µl Interner Standard).

#### 4.1.2.3.3. Verwendung von Stammlösungen (wässrig und organisch)

Zu einer wässrigen Stammlösung von Fomocain-HCl (2,88mM) in Isotonischer NaCl-Lösung wurde eine Stammlösung von Fomocain in Aceton (500mM) in verschiedenen Mengen gegeben (Tabelle 24).

|                   | <b>Fomocain-HCl<br/>2,88mM</b> | <b>Fomocain-Base<br/>500mM</b> | <b>Theoretische<br/>Endkonzentration</b> |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| <b>Mischung 1</b> | 1                              | 20                             | 0,94%                                    |
| <b>Mischung 2</b> | 1                              | 10                             | 0,99%                                    |
| <b>Mischung 3</b> | 1                              | 5                              | 1,01%                                    |
| <b>Mischung 4</b> | 1                              | 3,5                            | 1,15%                                    |
| <b>Mischung 5</b> | 1                              | 3                              | 1,20%                                    |
| <b>Mischung 6</b> | 1                              | 2,5                            | 1,26%                                    |

**Tabelle 25** Mischungsverhältnisse zur Mischmizellbildung aus wässrigem und organischem Lösungsmittel

Es erfolgte ausschließlich eine visuelle Beurteilung der Proben nach der Zugabe der Fomocain-Stammlösung in Aceton. Auf die HPLC-Gehaltsbestimmung wurde verzichtet, da aus allen Mischungen die Base präzipitierte bzw. weil die Versuche 4.1.2.3.1. (Seite 62) und 4.1.2.3.2. (Seite 63) keine zufriedenstellenden Ergebnisse erbracht hatten.

### 4.1.3. Verwendung von Lösungsvermittlern

Durch die Verwendung von Lösungsvermittlern kann die Löslichkeit von schwer löslichen Substanzen deutlich verbessert werden. Die als Lösungsvermittler eingesetzten Stoffe sind solche mit stark ausgeprägten hydrophilen polaren Gruppen im Molekül. Bevorzugt werden stark hydroxylhaltige Substanzen, z.B. ein- und mehrwertige Alkohole, eingesetzt. Die Lösungsvermittlung wird durch die Bildung von Wasserstoffbrücken oder auf Komplexbildung bzw. auf das Herabsetzen der Oberflächenspannung zurückgeführt.

#### 4.1.3.1. Geräte

##### 1. HPLC

siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen A

##### 2. pH-Wert

siehe 4.6.1. (Seite 96)

#### 4.1.3.2. Materialien

Es wurden die in Tabelle 26 aufgeführten Lösungsvermittler in den entsprechend angegebenen Konzentrationen verwendet. Das Ethanolamin stammte von der Fa. Merck (Darmstadt, BRD) in Synthesequalität, 99%. Alle anderen Verbindungen wurden in p.A.-Qualität mit Analysenzertifikaten von Caelo GmbH (Hilden, BRD) bezogen.

| Lösungsvermittler      | Verwendete Konzentrationen   |
|------------------------|------------------------------|
| Mannitol               | 4,5% (m/V)                   |
| Sorbitol               | 4,5% (m/V)                   |
| Inositol               | 4,5% (m/V)                   |
| Nicotinamid            | 0,12%, 1,22% (m/V)           |
| Glycerol               | 2,5%, 35%, 80% (m/V)         |
| Propylenglycol         | 2,5%, 35%, 80% (m/V)         |
| Ethanolamin            | 0,6%, 1,2% (m/V)             |
| Dimethylisobutyl (DMI) | 5%, 10%, 20%, 30%, 40% (V/V) |

**Tabelle 26** Verwendete Lösungsvermittler mit Konzentrationen

Die Fomocain-Base stammte, wie in den vorangegangenen Versuchen, aus eigener Synthese.

In Tabelle 8 (Seite 23) sind die Lösungsvermittler mit den entsprechenden Ergebnissen und den verwendeten Lösungsmitteln zusammengefasst. Als Lösungsmittel kamen Phosphat-Puffer EuAB (pH 7,4), Isotonische NaCl-Lösung (NaCl 0,9% in Aqua dest., Merck, Darmstadt, BRD) und Ringer-Lösung aus Ringer-Tabletten (Merck, Darmstadt, BRD) zum Einsatz. Bei der zusätzlichen Verwendung von Mg-hydrogenaspartat (Merck, Darmstadt, BRD) als Puffersubstanz, wurde Aqua dest. anstelle des Lösungsmittels Phosphat-Puffer benutzt.

Die Filtration aller Proben erfolgte mittels Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, 0,22µm, PVDF (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD).

#### 4.1.3.3. Methoden

Die o.g. Lösungsmittel wurden zubereitet und ihr exakter pH-Wert bestimmt. Anschließend erfolgte daraus die Herstellung der jeweiligen Konzentration des Lösungsvermittlers. Bei der Verwendung von Mg-hydrogenaspartat, welches in einer Konzentration von 25,7mg/ml zur Anwendung kam, wurde diese Puffersubstanz der Mischung Lösungsvermittler-Lösungsmittel zugesetzt. Unter ständigem Rühren erfolgte die Zugabe von Fomocain-Base. Die Einwaage des Lokalanästhetikums wurde so gewählt, dass im Falle einer vollständigen Löslichkeit der Substanz eine 2%ige Lösung entstand. Nach pH-Wert-Bestimmung und dessen Anpassung auf 7,4 (- 0,2 pH-Einheiten) mit 0,1N-NaOH oder 0,1N-HCl und 24 h Rühren wurden alle Proben visuell beurteilt. Nach der Filtration erfolgte die HPLC-Gehaltsbestimmung (50µl Filtrat, 100µl Interner Standard, 850µl Fließmittel).

Ansätze, die eine deutliche Erhöhung der Fomocain-Löslichkeit zeigten, wurden als Rückstellmuster 100 d bei RT unter Lichtschutz gelagert und anschließend beurteilt.

#### 4.1.4. Bildung einer Einschlussverbindung (EV)

Eine EV ist definitionsgemäß eine Molekülverbindung, bei der kleinere Moleküle in Hohlräume von größeren eingelagert sind. Die Suche nach geeigneten Molekülen mit ausreichend großem Hohlraum zur Einlagerung des Fomocain führte zu den Cyclodextrinen (CD), die Kanaleinschlussverbindungen bilden. Zur Verfügung stehen



primär die nativen CD,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD, sowie eine Vielzahl substituierter Derivate. Auf Grund guter Datenlage und ausgezeichneten pharmakologisch-toxikologischen Eigenschaften sowie sehr guter Wasserlöslichkeit kam nur das hydroxypropylierte Derivat des  $\beta$ -CD zur Anwendung.

#### 4.1.4.1. Geräte

##### 1. HPLC

siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen A

##### 2. pH-Wert

siehe 4.6.1. (Seite 96)

#### 4.1.4.2. Materialien

Die CD,  $\gamma$ -CD und 2-HP- $\beta$ -CD stammten von der Fa. Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz. Die verwendete Fomocain-Base stammte aus eigener Herstellung im Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der FSU Jena. Das Lösungsmittel wurde aus Ringer-Tabletten (Merck, Darmstadt, BRD) in destilliertem Wasser zubereitet. Die Filtration aller Proben erfolgte mittels Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, 0,22 $\mu$ m, PVDF (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD).

#### 4.1.4.3. Methoden

Von  $\gamma$ -CD wurde eine Konzentrationsreihe von 5%, 10% und 15% (m/V) in Ringer-Lösung angefertigt. Das zweite CD-Derivat, 2-HP- $\beta$ -CD, kam in 5%, 10%, 20%, 30%, 40% und 50% (m/V) im gleichen Lösungsmittel zum Einsatz. Unter ständigem Rühren erfolgte die Zugabe von Fomocain-Base zu diesen Konzentrationen. Die Einwaage des Lokalanästhetikums wurde so gewählt, dass im Falle einer vollständigen Löslichkeit der Substanz eine 5%ige Lösung entstand. Nach pH-Wert Überprüfung und ggf. dessen Anpassung auf 7,4 (- 0,2 pH-Einheiten) mit 0,1N-NaOH wurden die Ansätze 24 h gerührt. Anschließend erfolgte eine visuelle Beurteilung. Nach der Filtration und 1:10 Verdünnung mit HPLC-Fließmittel schloss sich die HPLC-Gehaltsbestimmung (50 $\mu$ l Verdünnung, 100 $\mu$ l Interner Standard, 850 $\mu$ l Fließmittel) an.

Weiterhin wurden die Proben mit 40% und 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD erneut hergestellt und zusätzlich erwärmt, um ggf. eine Basenkonzentrationserhöhung zu erreichen. Die Weiterverarbeitung erfolgte analog dem vorher Genannten.

Sämtliche wässrige, cyclodextrinhaltige Ansätze wurden gelagert (RT, Lichtschutz) und in kontinuierlichen Abständen (sofort, 72 h, 120 h, 240 h, 480 h, 1200 h, 2400 h) beurteilt. Nach 100d erfolgte eine erneute Gehaltsbestimmung.

#### **4.2. Einschlussverbindung von Fomocain in 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin**

Die EV des Fomocain sollte aus pharmakologischen Gründen hinsichtlich ihrer Eigenschaften genauer charakterisiert werden. Dazu zählten neben dem Einfluss des Substitutionsgrades des 2-HP- $\beta$ -CD auch die Auswirkungen zugesetzter weiterer Stoffe, wie Wasserstrukturbrecher und -bildner. Auch die Stabilität der Lösung, Bindungskonstanten bzw. pharmakologisch-toxikologische Daten mussten erhoben werden.

##### **4.2.1. Darstellung unterschiedlich substituierter 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine**

Die Synthesen wurden nach J. PITHA et al.<sup>53</sup> durchgeführt. Abweichend von dieser Vorschrift wurde ohne Dialyse des Ansatzes gearbeitet, sondern in Anlehnung an BREWSTER et al.<sup>54</sup> mit Aceton von während der Synthese entstandenen Oligopropylenglycolen gereinigt.

###### **4.2.1.1. Synthese von 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin DS: 5,1**

15,425g (0,385mol) NaOH in 75ml destilliertem Wasser wurden in einem Kolben mit 50g  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD) versetzt. Die Mischung wurde bis zum vollständigen Lösen des  $\beta$ -CD bei 50-60°C gerührt. Anschließend wurde der Kolben in ein Eisbad getaucht und unter starkem Rühren über die Dauer von 3 h tropfenweise 23,75ml (19,7g, 0,34mol) Propylenoxid zugegeben. Dabei musste der Rückfluss des Kondensats gewährleistet werden. Die entstandene klare, gelbliche, hochviskose Lösung wurde bei 0-5°C über Nacht gerührt. Als Kontrolle auf noch vorhandene Ausgangsmaterialien diente die DC (4.2.2.3., Seite 70).

Nach dem Anpassen des Gemisches auf Raumtemperatur erfolgte vorsichtige Neutralisation mit 10% iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Die anschließende Vakuumdestillation lieferte eine sirupartige zähe Masse. Nach Zugabe von 250ml Ethanol 95% und 30 min Rühren, bildete sich ein weißer Niederschlag von in Ethanol unlöslichem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Der Niederschlag wurde abfiltriert und zweimal mit 25ml Ethanol (95%) gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, der entstandene zähe Sirup mit 100ml Wasser aufgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach Gefriertrocknung entstand eine weiße Festsubstanz.

Die gesamte erhaltene Festsubstanz wurde in 500ml Aceton gelöst, stark gerührt, nach 24h mit weiteren 250ml Aceton versetzt und noch einmal 24 h gerührt. Der Rückstand der Filtration lieferte eine rein weiße Festsubstanz, die 4 h im Vakuum getrocknet wurde und nach Aufnahme in 400ml Wasser und Einfrieren der Gefriertrocknung unterworfen wurde. Es entstanden 30g (60% d. Th.) reinweißer Substanz.

#### 4.2.1.2. Synthese von 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin DS: 6,8

Die Synthese wurde analog den unter 4.2.1.1. beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die einzige Abweichung bestand in der Menge des Propylenoxids. Es kamen hier 31,25ml (25,92g, 0,447mol) Propylenoxid zum Einsatz. Als Kontrolle auf noch vorhandene Ausgangsmaterialien diente die DC (4.2.2.3., Seite 70).

Es entstanden 20g (40% d. Th.) reinweißer Substanz.

#### 4.2.1.3. Synthese von 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin DS: 7,2

15,425g (0,385mol) NaOH in 125ml destilliertem Wasser wurden in einem Kolben mit 55,0g  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD) versetzt. Die Mischung wurde bis zum vollständigen Lösen des  $\beta$ -CD bei  $50-60^\circ\text{C}$  gerührt. Anschließend wurde der Kolben in ein Eisbad getaucht und unter starkem Rühren über die Dauer von 3 h tropfenweise 58,5ml (48,52g, 0,84mol) Propylenoxid zugegeben. Die entstandene klare, gelbliche, hochviskose Lösung wurde über Nacht gerührt. Als Kontrolle auf noch vorhandene Ausgangsmaterialien diente die DC (4.2.2.3., Seite 70).

Nach dem Anpassen des Gemisches auf Raumtemperatur erfolgte vorsichtige Neutralisation mit 10% iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Die anschließende Vakuumdestillation lieferte eine sirupartige zähe Masse. Nach der Zugabe von 250ml Ethanol (95%) und 30 min Rühren,

bildete sich ein weißer Niederschlag von in Ethanol unlöslichem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Der Niederschlag wurde abfiltriert und zweimal mit 25ml Ethanol 95% gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, der entstandene zähe Sirup mit 100ml Wasser aufgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Bei der Gefriertrocknung entstand eine weiße Festschubstanz.

Die Substanz wurde in 500ml Ethanol (95%) gelöst und tropfenweise zu 1500ml Aceton gegeben. Nach 30 min Rühren und dem Absetzen des Präzipitats wurde der Ansatz dekantiert, gefiltert und mit Aceton gewaschen. Nach 6 h Trocknung unter Vakuum entstanden 20g einer gelblichen, aromatisch riechenden Festschubstanz.

#### 4.2.2. Analytik unterschiedlich substituierter 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine

##### 4.2.2.1. MS/ESI

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem Tripel-Quadrupol Massenspektrometer VGQuadro der Firma Fisons Instruments (Mainz-Castel). Das Gerät des Hans-Knöll-Instituts Jena arbeitete mit Elektrosprayionisation.

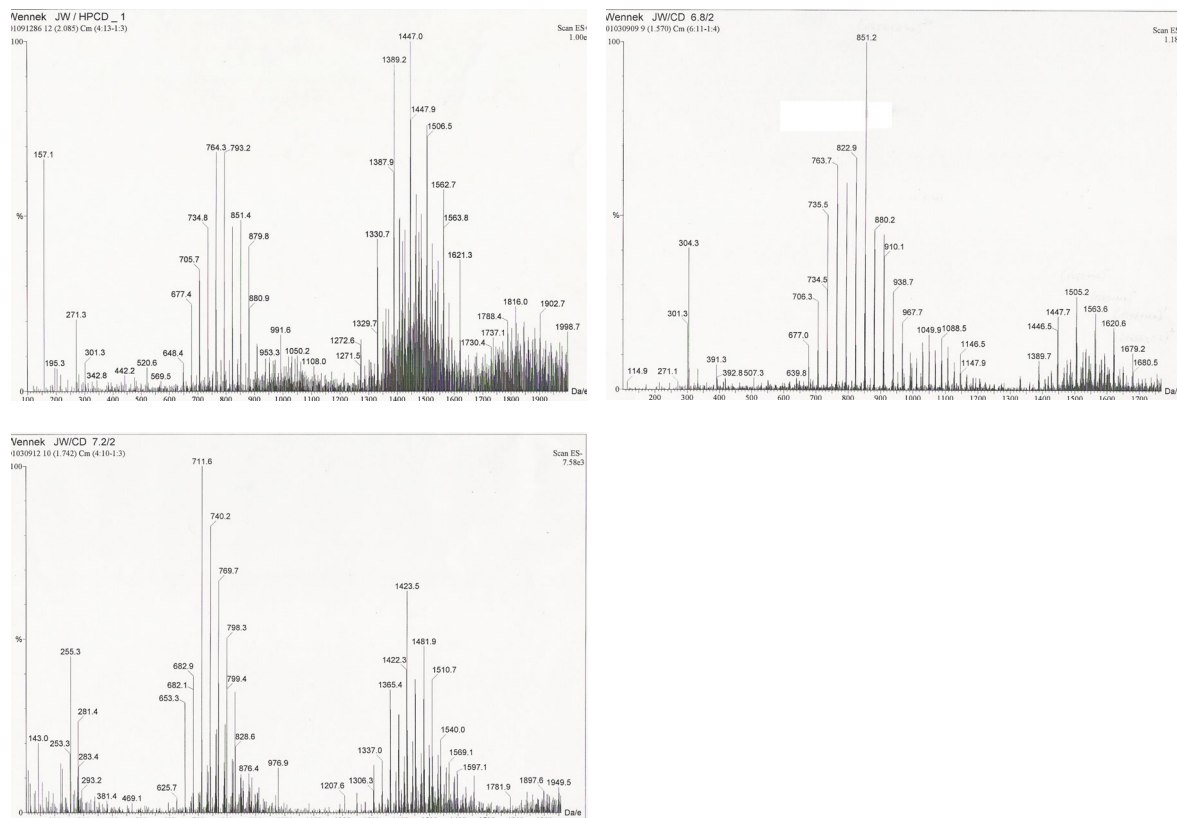


Abbildung 25 MS-ESI Spektren von 2-HP- $\beta$ -CD (DS: 5,1, DS: 6,8, DS: 7,2)

#### 4.2.2.2. NMR

Diese Analytik wurde nach SUZUKI et al.<sup>55</sup> am Institut für Organische Chemie der FSU Jena durchgeführt. Dabei kam ein NMR Gerät der Fa. Bruker (Avance, 400MHz) zum Einsatz.

Es sollte getestet werden, ob die synthetisierten Derivate frei von Lösungsmittel waren. Weiterhin diene die NMR-Analytik der Verifizierung der Ergebnisse der MS/ESI-Spektroskopie.

#### 4.2.2.3. Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die DC wurden mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtete HPTLC-Platten der Firma Merck (Darmstadt, BRD) verwendet. Als Fließmittel diene ein Aceton-Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 5:1:1. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254nm (DESAGA/Heidelberg). Im Anschluss wurde die Platte mit 25%iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> besprüht und über 15 min bei 110°C erhitzt

Die Prüfung diene zur Testung auf den vollständigen Substanzumsatz bei der Synthese und zum Ausschluss der Bildung von Oligopropylenglycolen, welche durch verstärkte Schweifbildung zu identifizieren sind.

#### 4.2.2.4. Infrarot-Spektroskopie (IR)

Die Registrierung der IR-Spektren im Wellenlängenbereich von 4000-400cm<sup>-1</sup> erfolgte mit Hilfe des Magna-IR Spektrometers 550 (Nicolet, Madison, USA). Dazu wurde ein Pressling aus 1mg Substanz und ca. 150mg getrocknetem KBr (Merck, Darmstadt, BRD) angefertigt. Die Spektren (Abbildung 26, Abbildung 27, Abbildung 28) der drei substituierten Derivate erscheinen nur wenig differenziert.

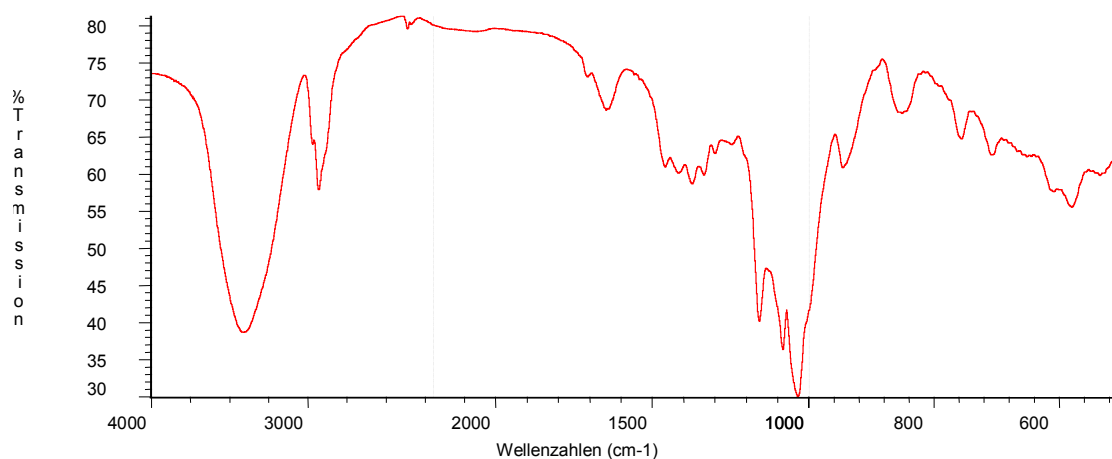


Abbildung 26 IR-Spektrum 2-HP- $\beta$ -CD, Eigensynthese DS 5,1

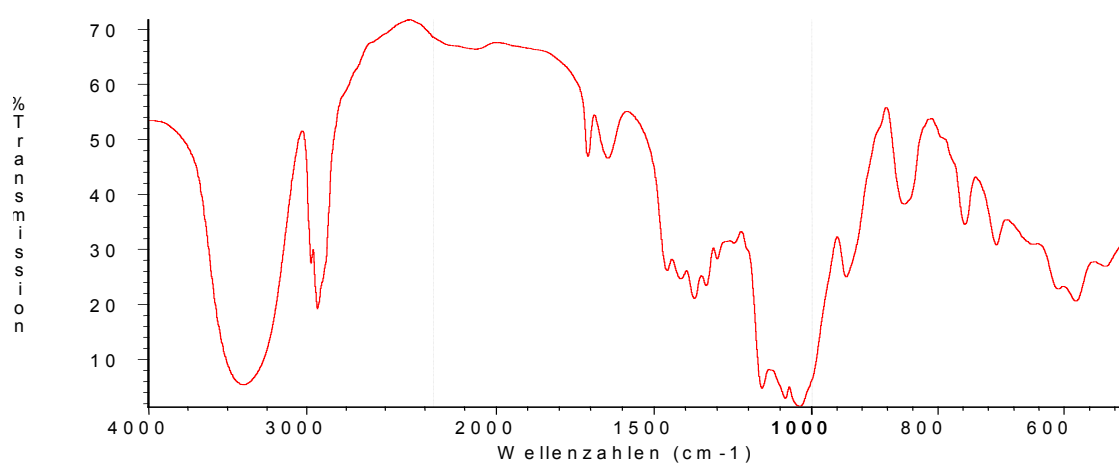


Abbildung 27 IR-Spektrum 2-HP- $\beta$ -CD, Eigensynthese DS 6,8

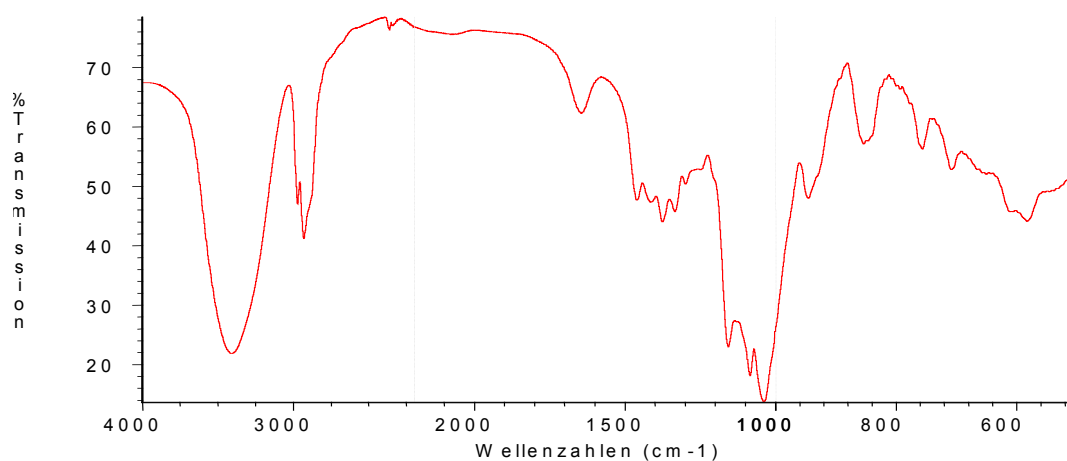


Abbildung 28 IR-Spektrum 2-HP- $\beta$ -CD, Eigensynthese DS 7,2

### 4.2.3. Auswirkungen des Substitutionsgrades auf die Einschlussverbindung

#### 4.2.3.1. Geräte

##### 1. HPLC

siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen A

##### 2. pH-Wert

siehe 4.6.1. (Seite 96)

#### 4.2.3.2. Materialien

Bei dem Versuch kamen die unter 4.2.1. (Seite 67) dargestellten Verbindungen zum Einsatz. Als Vergleich diente die Handelsware von 2-HP- $\beta$ -CD (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz). Die verwendete Fomocain-Base stammte aus eigener Herstellung im Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der FSU Jena. Das Lösungsmittel wurde aus Ringer-Tabletten (Merck, Darmstadt, BRD) in destilliertem Wasser zubereitet.

#### 4.2.3.3. Methode

Von jeder Charge 2-HP- $\beta$ -CD wurde eine Konzentrationsreihe mit 20%, 30%, 40% und 50% (m/V) in Ringer-Lösung zubereitet. Nach Zugabe eines Überschusses von Fomocain-Base (berechnet aus vorangegangenen Versuchen 4.1.4., Seite 65) wurde zunächst 1 h gerührt und anschließend der pH-Wert der Lösung bestimmt. Wenn notwendig, erfolgte mit 0,1N-NaOH eine pH-Wert Einstellung auf 7,40. Nach weiteren 23 h Rühren wurde die Lösung über einen Rotilabo®-Spritzenfilter, 0,22 $\mu$ m, PVDF (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD) filtriert, um ungelöstes Fomocain abzutrennen. Die entstandene klare, gelbliche Lösung wurde 1:10 mit HPLC-Fließmittel verdünnt und 50 $\mu$ l davon mit 100 $\mu$ l Internem Standard und 850 $\mu$ l Fließmittel versetzt. Die Gehaltsbestimmung dieser Mischung erfolgte mittels HPLC.

Um die Qualität der Proben zu beurteilen und um Aussagen hinsichtlich der Stabilität treffen zu können, wurde von jedem Ansatz 1ml Lösung als Rückstellmuster bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 100 d gelagert.

#### 4.2.4. Auswirkungen von Wasserstrukturbildnern und –brechern auf die Einschlussverbindung

##### 4.2.4.1. Geräte

###### 1. HPLC

siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen A

###### 2. pH-Wert

siehe 4.6.1. (Seite 96)

##### 4.2.4.2. Materialien

Bei dem verwendeten 2-HP- $\beta$ -CD handelt es sich um die kommerziell erhältliche Ware (Fluka Chemie GmbH, Buch, Schweiz). Als Wasserstrukturbrecher kamen Nicotinamid und Harnstoff (Caelo GmbH, Hilden, BRD), als Wasserstrukturbildner Sorbitol (Caelo GmbH, Hilden, BRD) zum Einsatz. Die Fomocain-Base und die Ringer-Lösung entsprachen den bisher beschriebenen Substanzen.

##### 4.2.4.3. Methode

Nicotinamid, Harnstoff und Sorbitol wurden zu 50% (m/V) in Ringer-Lösung gelöst. In die klaren Lösungen wurde eine Menge 2-HP- $\beta$ -CD gegeben, die der Konzentration von 20%, 30%, 40% bzw. 50% (m/V) entsprach. Nach dem vollständigen Lösen des 2-HP- $\beta$ -CD erfolgte die Zugabe eines Überschusses an Fomocain. Die Probenansätze wurden kurz gerührt und dann 7 Tage bei Raumtemperatur gelagert. Im Anschluss daran erfolgte eine Kontrolle der pH-Werte und ggf. die Einstellung auf pH 7,40 mit 0,1N-HCl (bei Harnstoff) bzw. 0,1N-NaOH. Abschließend wurden die Proben 24 h bei 23°C im Schüttelwasserbad kontinuierlich gemischt und dann von ungelöstem Fomocain durch Filtration befreit. Die entstandene klare, gelbliche Lösung wurde 1:10 mit HPLC-Fließmittel verdünnt und 50  $\mu$ l davon wurden mit 100  $\mu$ l Internem Standard und 850  $\mu$ l Fließmittel versetzt. Die Gehaltsbestimmung dieser Mischung erfolgte mittels HPLC.

Jeweils 1ml Probe wurde als Rückstellmuster bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz 100 d gelagert.



### 4.3. Charakterisierung der Einschlussverbindung von Fomocain und der Derivate OE 7000 und OE 9000

#### 4.3.1. EV von OE 7000 und OE 9000

Analog zur Stammsubstanz Fomocain erfolgte die Herstellung einer Zubereitung von OE 7000 und OE 9000 in 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD. Die beiden Diethanolamin-Derivate stammten aus eigener Herstellung im Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der FSU Jena. Die Konzentration der beiden Substanzen entsprach der des Fomocain und betrug 40mg/ml. Als Lösungsmittel wurde Ringer-Lösung aus Ringer-Tabletten (Merck, Darmstadt, BRD) verwendet. Die Substanzen lösten sich schnell (<30min). Im Anschluss daran wurde der pH-Wert kontrolliert und mit 0,1N-NaOH (Merck, Darmstadt, BRD) auf 7,4 eingestellt und filtriert.

Die Filtration aller Proben erfolgte mittels Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, 0,22 $\mu$ m, PVDF (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD).

#### 4.3.2. Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilitätsuntersuchungen erfolgten vor dem Hintergrund der bekannten mikrobiellen Anfälligkeit von cyclodextrinhaltigen (zuckerhaltigen) Lösungen. Ziel war es, eine Aussage zu treffen, ob und wie lange Zubereitungen der drei Substanzen in 2-HP- $\beta$ -CD problemlos haltbar sind. Dabei wurde das Aussehen der Probe beurteilt und dann der Gehalt an Wirkstoff analysiert.

##### 4.3.2.1. Geräte

###### 1. pH-Wert

siehe 4.6.1. (Seite 96)

###### 2. HPLC

siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen A

#### 4.3.2.2. Materialien

Zur Verwendung kamen die unter 4.1.4. (Seite 65) und 4.3.1. (Seite 74) hergestellten Lösungen von Fomocain bzw. OE 7000, OE 9000 in 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD. Bei dem angewandten 2-HP- $\beta$ -CD handelt es sich um die kommerziell erhältliche Ware (Fluka Chemie GmbH, Buch, Schweiz).

#### 4.3.2.3. Methoden

Von jeder Substanz wurden je drei o.g. identische Zubereitungen angefertigt. Alle wurden nach einer 1:10 Verdünnung mit HPLC-Fließmittel mit Hilfe der HPLC auf den Gehalt getestet (50  $\mu$ l Verdünnung, 100  $\mu$ l Interner Standard, 850  $\mu$ l Fließmittel). Im Anschluss daran wurden die Proben unterschiedlichen Wärmeeinflüssen ausgesetzt:

- Keine Wärmebehandlung
- 50°C, 1 h
- Dampfsterilisation (121°C, 15 min).

Nach abgeschlossener Wärmebehandlung wurde wie oben beschrieben erneut eine Gehaltsbestimmung durchgeführt. Diese erfolgte weiterhin in kontinuierlichen Abständen (14 d, 30 d, 50 d, 100 d) verbunden mit einer visuellen Begutachtung der Lösungen nach Lagerung bei RT unter Lichtschutz.

Eine abschließende Beurteilung der Rückstellmuster wurde nach einem Jahr durchgeführt.

#### 4.3.3. Viskosität

Die Viskosität, Zähigkeit oder innere Reibung ist eine wichtige Größe zur Beschreibung von Fließeigenschaften von Stoffen. Hochviskose Lösungen sind durch ihre schlechte Filtrierbarkeit technologisch anspruchsvoller. Diese zähen Zubereitungen können weiterhin praktisch schlechter anwendbar sein und zu Reizungen und Schmerzen an der Injektionsstelle führen.

Zur Bestimmung dieses Parameters Viskosität war es gleichzeitig notwendig, die Dichte der Lösungen zu ermitteln.

#### 4.3.3.1. Geräte

##### 1. Dichte

Densimeter DMA 602 / DMA 60 Anton Paar KG., Graz, Austria

##### 2. Viskosität

Ubbelohde<sup>®</sup> Viskosimeter, Fa. Schott, Hofheim am Ts.

Kapillare Typ 537 10 (App. Nr. 01008446), Software VPC 31/VPC 38

#### 4.3.3.2. Materialien

Es wurde ein Phosphatpuffer pH 2,5 verwendet (50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> zur pH-Wert-Einstellung). Das verwendete 2-HP-β-CD war die kommerziell erhältliche Ware (Fluka Chemie GmbH, Buch, Schweiz).

#### 4.3.3.3. Methoden

Der Viskositätsbestimmung mit Hilfe des Kapillarviskosimeters liegt das Hagen-Poiseuillesche Gesetz (Gleichung 4) zu Grunde. Demnach ist bei laminarer Strömung die Auslaufzeit  $t$  der zu untersuchenden Flüssigkeit zwischen zwei Messmarken einer genormten Kapillare direkt proportional zur Viskosität  $\eta$ .  $K$  ist eine vom Hersteller angegebene Gerätekonstante.

$$\eta = \zeta \cdot \boxed{g \frac{\pi \cdot h \cdot r^4}{8 \cdot l \cdot V}} t$$

$\downarrow$   
 $\eta = \zeta \cdot k \cdot t$

**Gleichung 4** Hagen-Poiseuillesches Gesetz

Die Bestimmungen wurden nach fünfminütigem Vortemperieren bei 25°C jeweils fünf mal durchgeführt. Computergesteuert erfolgte das Aufziehen der Flüssigkeit über die oberste Markierung der Kapillare. Die Zeit der Passage des Flüssigkeitsmeniskus zwischen den Messmarkierungen wurde bestimmt und der Mittelwert der absoluten Viskosität errechnet. Die gesuchte dynamische Viskosität ergibt sich als Quotient aus abs. Viskosität und der Dichte.

| 2-HP- $\beta$ -CD | Messung |        |        |        |        | Absolute Viskosität  | Dichte          | Dynamische Viskosität |
|-------------------|---------|--------|--------|--------|--------|----------------------|-----------------|-----------------------|
| [mg/ml]           | 1       | 2      | 3      | 4      | 5      | [mm <sup>2</sup> /s] | [g/ml]          | [mPa*s]               |
| <b>Wasser</b>     | 100,35  | 102,35 | 102,19 | 102,27 | 102,24 | 1,0059               | <b>0,998206</b> | <b>1,0041</b>         |
| <b>0</b>          | 103,58  | 103,45 | 103,66 | 103,40 | 103,39 | 1,0177               | <b>1,003017</b> | <b>1,0208</b>         |
| <b>10</b>         | 106,34  | 114,82 | 106,35 | 106,40 | 106,37 | 1,0638               | <b>1,006444</b> | <b>1,0707</b>         |
| <b>20</b>         | 109,26  | 109,24 | 109,26 | 109,29 | 109,28 | 1,0759               | <b>1,009329</b> | <b>1,0859</b>         |
| <b>30</b>         | 113,42  | 112,98 | 112,90 | 112,90 | 112,87 | 1,1137               | <b>1,012874</b> | <b>1,1280</b>         |
| <b>40</b>         | 116,24  | 116,22 | 116,98 | 116,23 | 116,25 | 1,1476               | <b>1,015780</b> | <b>1,1657</b>         |
| <b>50</b>         | 119,66  | 119,60 | 119,60 | 119,87 | 127,17 | 1,1958               | <b>1,018557</b> | <b>1,2180</b>         |

Tabelle 27 Viskositätsbestimmung unterschiedlicher 2-HP- $\beta$ -CD Konzentrationen

Die Dichtebestimmung erfolgte als massenabhängige, elektronische Frequenz- bzw. Schwingungsdauermessung an einem Densimeter. Dabei wird die flüssige Probe in ein U-Rohr gesaugt. Nach dem Befüllen mit unterschiedlich konzentrierten 2-HP- $\beta$ -CD-Lösungen erfolgte die Anregung zur Schwingung. Die Schwingungsfrequenz wird durch die schwingende Masse festgelegt. Die Änderung der Frequenz des leeren und des befüllten U-Rohres verläuft proportional zur Dichte der Lösung. Für jede Probe wurde eine computergesteuerte Dreifachmessung durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

| Probenbezeichnung          | Messwert | Dichte von Wasser | Gerätekonstante | Dichte der Probe | Mittelwert      |
|----------------------------|----------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|
|                            |          | [g/ml]            |                 |                  | [g/ml]          |
| <b>0 mg/ml bei pH 2,5</b>  | 1,854858 | 0,998206          | 0,617606845     | 1,003017         |                 |
| <b>0 mg/ml bei pH 2,5</b>  | 3,709671 | 0,998206          | 0,154402162     | 1,002970         |                 |
| <b>0 mg/ml bei pH 2,5</b>  | 7,419330 | 0,998206          | 0,038600239     | 1,002953         | <b>1,002980</b> |
| <b>10 mg/ml bei pH 2,5</b> | 1,856354 | 0,998206          | 0,617606845     | 1,006446         |                 |
| <b>10 mg/ml bei pH 2,5</b> | 3,712708 | 0,998206          | 0,154402162     | 1,006451         |                 |
| <b>10 mg/ml bei pH 2,5</b> | 7,425408 | 0,998206          | 0,038600239     | 1,006436         | <b>1,006444</b> |
| <b>20 mg/ml bei pH 2,5</b> | 1,857607 | 0,998206          | 0,617606845     | 1,009320         |                 |
| <b>20 mg/ml bei pH 2,5</b> | 3,715227 | 0,998206          | 0,154402162     | 1,009340         |                 |
| <b>20 mg/ml bei pH 2,5</b> | 7,430450 | 0,998206          | 0,038600239     | 1,009327         | <b>1,009329</b> |
| <b>30 mg/ml bei pH 2,5</b> | 1,859228 | 0,998206          | 0,617606845     | 1,013041         |                 |
| <b>30 mg/ml bei pH 2,5</b> | 3,718239 | 0,998206          | 0,154402162     | 1,012797         |                 |
| <b>30 mg/ml bei pH 2,5</b> | 7,436476 | 0,998206          | 0,038600239     | 1,012785         | <b>1,012874</b> |
| <b>40 mg/ml bei pH 2,5</b> | 1,860419 | 0,998206          | 0,617606845     | 1,015777         |                 |
| <b>40 mg/ml bei pH 2,5</b> | 3,720842 | 0,998206          | 0,154402162     | 1,015786         |                 |
| <b>40 mg/ml bei pH 2,5</b> | 7,441683 | 0,998206          | 0,038600239     | 1,015775         | <b>1,015780</b> |
| <b>50 mg/ml bei pH 2,5</b> | 1,861632 | 0,998206          | 0,617606845     | 1,018566         |                 |
| <b>50 mg/ml bei pH 2,5</b> | 3,723255 | 0,998206          | 0,154402162     | 1,018560         |                 |
| <b>50 mg/ml bei pH 2,5</b> | 7,446505 | 0,998206          | 0,038600239     | 1,018546         | <b>1,018557</b> |

Tabelle 28 Messwerte der Dichtebestimmung

#### 4.3.4. Bindungskonstanten

##### 4.3.4.1. Geräte

CE-Gerät: Beckman P/ACE 5510 (Beckman Instruments, USA)

Diodenarray-Detektor

Kapillare: fused silica-Kapillare mit 50µm ID und 375µm AD (BGB Analytik AG, Schloßböckelheim, BRD)

Software P/ACE Station Version 1.2.

##### 4.3.4.2. Materialien

Es wurde ein Phosphatpuffer pH 2,5 verwendet (50mM  $K_2HPO_4$ ,  $H_3PO_4$  zur pH-Wert-Einstellung). Das 2-HP-β-CD war die kommerziell erhältliche Ware (Fluka Chemie GmbH, Buch, Schweiz). Die Fomocain-Base, OE 7000-HCl und OE 9000-HCl stammten aus eigener Herstellung im Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der FSU Jena.

##### 4.3.4.3. Methode

Die CE-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Falko Süß, Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Scriba, im Institut für Pharmazie der FSU Jena durchgeführt. Der zu untersuchende Stoff wurde dabei dem jeweils unterschiedlich konzentrierten Trennpuffer (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% m/V 2-HP-β-CD) zugesetzt. Der Analyt bewegt sich während der elektrophoretischen Wanderung durch eine Phase konstanter Ligandkonzentration (CD+Puffer). Dabei kommt es zur Einstellung des Gleichgewichts. Die Mobilität der Substanzen ist dabei abhängig von der Konzentration des Liganden im Puffer.

##### 4.3.5. Einfluss von 2-HP-β-CD auf biochemische Parameter

Neben der allgemeinen Charakterisierung der EV musste ausgeschlossen werden, dass durch die Verwendung des 2-HP-β-CD die PEB bzw. die Kinetik der Verbindungen verändert wird.

**4.3.5.1. Geräte**

siehe 4.7.1. (Seite 96)

**4.3.5.2. Materialien**

Zur Verwendung kamen die unter 4.1.4. (Seite 65) und 4.3.1. (Seite 74) hergestellten Lösungen von Fomocain bzw. OE 7000, OE 9000 in 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD. Bei dem angewandten 2-HP- $\beta$ -CD handelt es sich um die kommerziell erhältliche Ware (Fluka Chemie GmbH, Buch, Schweiz).

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel hatten p.A.- bzw. HPLC-Qualität.

Die Filtration aller Proben erfolgte mittels Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, 0,22 $\mu$ m, PVDF (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD).

Das benötigte Humanserum für die Bestimmung der PEB wurde vom Institut für Transfusionsmedizin der Friedrich-Schiller-Universität bereit gestellt.

Die Materialien zur Ermittlung der In-vitro Metabolisierung sind unter 4.5.2. (Seite 90) beschrieben.

**4.3.5.3. Methoden**

Die Bestimmung der PEB erfolgte mittels Ultrafiltration und ist unter 4.5.1. (Seite 88) beschrieben.

Die Ermittlung der In-vitro Metabolisierung erfolgte durch Inkubationsversuche in Rinderlebermikrosomenhomogenaten analog 4.5.2. (Seite 90).

**4.3.6. Pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen**

Alle zur Verfügung stehenden Substanzen wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena unter Leitung von Prof. Dr. C. Fleck geprüft. Über die Ergebnisse liegen Publikationen<sup>50, 60</sup> vor.

**Fomocain-Derivate als Alternative zum Fomocain****4.4. Physikalisch – chemische Eigenschaften der Fomocain-Analoga****4.4.1. Bestimmung der Löslichkeit**

Zur Untersuchung kamen jeweils die Base und das Hydrochlorid jeder Verbindung.

Die Bestimmung der Löslichkeiten erfolgte in Wasser und in Pufferlösung pH 7,4 gemäß der Definition des Europäischen Arzneibuchs, Ausgabe 1997. Für die Versuchsreihe wurde eine Substanzeinwaage von 10mg gewählt und das Maximalvolumen an Lösungsmittel auf 250ml begrenzt. Die Ermittlung der Löslichkeiten erfolgte durch schrittweise Zugabe von Wasser bzw. Pufferlösung. Das Resultat wurde nach den Angaben des Arzneibuchs formuliert. Eine Durchmischung des Versuchsansatzes wurde durch einen Magnetrührer (IKAMAG RCT basic, IKA<sup>®</sup>-Werke, Staufen, BRD) bei konstanter Drehzahl (300/min) erreicht.

| <b>Volumenteile Lösungsmittel für 1 Teil Substanz</b> | <b>Definition</b>   |
|---|---------------------|
| weniger 1 Teil  | sehr leicht löslich |
| von 1 Teil bis 10 Teile                               | leicht löslich      |
| über 10 Teile bis 30 Teile                            | löslich             |
| über 30 Teile bis 100 Teile                           | wenig löslich       |
| über 100 Teile bis 1000 Teile                         | schwer löslich      |
| über 1000 Teile bis 10000 Teile                       | sehr schwer löslich |
| über 10000 Teile                                      | praktisch unlöslich |

**Tabelle 29** Löslichkeitstabelle nach EuAB 1997

**4.4.2. Bestimmung der pK<sub>a</sub>-Werte.****4.4.2.1. Geräte**

siehe 4.6.2. (Seite 96)

**4.4.2.2. Methode**

Bedingt durch die schlechte Wasserlöslichkeit der freien Basen war eine pK<sub>a</sub>-Wert-Bestimmung im wässrigen Milieu nur schwer möglich.

Als Messverfahren wurde eine Methode in Anlehnung an GLASSL<sup>56</sup> gewählt. Die Konzentration an Hydrochlorid in der Stammlösung betrug  $10^{-3}$  M. Vor und während jeder Messung wurde die Analysenlösung zum Vertreiben des  $\text{CO}_2$  10 min mit  $\text{N}_2$  begast und im Verlauf der Titration unter Stickstoffatmosphäre gehalten. Vor Beginn der Bestimmung wurde zur Prüflösung 0,1N-HCl zugegeben. Somit war sichergestellt, dass die Base der jeweiligen Verbindung vollständig protoniert vorlag. Außerdem war so der Titrationsbeginn besser sichtbar. Am ersten Äquivalenzpunkt der Titrationskurve, dem Punkt, an welchem überschüssige Salzsäure verbraucht war, wurde der Titrationsbeginn festgelegt. Der zweite Äquivalenzpunkt markierte das Ende der Bestimmung. Nach jeder Zugabe eines definierten Volumens (0,03ml) des Titranden wurde der pH-Wert der Lösung gemessen. Aus der zugegebenen Menge NaOH und dem zugehörigen pH-Wert wurde nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung für jeden Titrationspunkt der  $\text{pK}_a$ -Wert berechnet. Der  $\text{pK}_a$ -Wert der Verbindung ergab sich aus dem arithmetischen Mittel der für jeden Titrationspunkt berechneten Werte. Für jede Verbindung erfolgte eine Vierfachbestimmung.

Der pH-Wert wurde mit einer pH-Einstabmesskette bestimmt. Das verwendete pH-Meter wurde vor Versuchsbeginn mit Standardpufferlösungen Qualilab<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt) im Bereich 4,00 – 7,00 kalibriert.

Die Äquivalenzpunkte wurden durch die verwendete Software ermittelt. Zur Überprüfung der Richtigkeit der automatischen Berechnung wurde aus dem jeweiligen Wertepaar für Volumen und pH-Wert der Anstieg der Funktion berechnet. Erreichte der Wert ein Maximum, so war ein Wendepunkt und somit ein Äquivalenzpunkt erreicht. Das Ergebnis der Softwareberechnung wurde mit dem der Anstiegsberechnung verglichen.

Um die Genauigkeit der Methode zu überprüfen, wurde ein Blindversuch mit Lidocain-HCl in  $10^{-3}$  M-Lösung durchgeführt. Der experimentell ermittelte  $\text{pK}_a$ -Wert stimmte mit 7,87 fast exakt mit dem in der Literatur angegebenen  $\text{pK}_a$ -Wert von 7,90 überein.

#### **4.4.3. Bestimmung der Trübungs-pH-Werte**

##### **4.4.3.1. Geräte**

siehe 4.6.1. (Seite 96)



#### 4.4.3.2. Methode

Definitionsgemäß ist der Trübungs-pH-Wert der pH-Wert, bei dessen Über- oder Unterschreitung eine Substanz aus einer Lösung auszufallen beginnt. Voraussetzung dafür ist ein deutlicher Löslichkeitsunterschied der Säure zur korrespondierenden Base sowie ein protonenabhängiges Dissoziationsgleichgewicht. Er ist von dem  $pK_a$ -Wert, der Löslichkeit der Verbindung, der Temperatur, der Konzentration sowie der Ionenstärke der Lösung abhängig.

Unter Trübungs- oder Fällungs-pH versteht man im Falle der Fomocain-Derivate den pH-Wert, bei dem die erste bleibende Trübung durch ausfallende freie Base auftritt, wenn die Hydrochlorid-Lösung mit Lauge titriert wird.

Zur Ermittlung des Trübungs-pH-Wertes wurde eine  $1 \times 10^{-3}$  M-Lösung der Hydrochloride hergestellt. Ihr wurde bis zur ersten bleibenden Trübung 0,01N-NaOH zugesetzt, anschließend mit 0,01N-HCl bis zum Verschwinden der Trübung zurücktitriert und der pH-Wert mit der unter 4.3.3.1. genannten pH-Einstabmesskette gemessen. Das verwendete pH-Meter wurde vor Versuchsbeginn mit Standardpufferlösungen Qualilab<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, BRD) im Bereich 4,00 – 10,00 kalibriert.

Zur Entfernung des vorhandenen  $CO_2$  und zur Durchmischung der Lösung wurde 10min vor und während der Titration mit Stickstoff begast. Die in der Tabelle 18 aufgeführten Werte sind die Mittelwerte aus fünf Bestimmungen.

Um das Lösen des Niederschlages der Base besser beobachten zu können, wurde vor einem schwarzen Hintergrund mit seitlich einfallendem Licht gearbeitet.

#### 4.4.4. Berechnung der Wasserlöslichkeit der Basen

Wenn sowohl der  $pK_a$ - als auch der Trübungs-pH-Wert einer Verbindung bekannt sind, kann die Wasserlöslichkeit der Base [B] nach folgender Formel berechnet<sup>57</sup>:

$$[B] = \frac{S}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

[B] = Wasserlöslichkeit der Base

S = Substratkonzentration

pH = Trübungs-pH-Wert bei der eingesetzten Konzentration S

In Tabelle 19 sind die errechneten Wasserlöslichkeiten der freien Basen in mmol/l und mg/l bzw. mg/ml angegeben.

#### 4.4.5. Bestimmung von Verteilungskoeffizient (P) und Distributionskoeffizient (D)

##### 4.4.5.1. Geräte

siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen B

##### 4.4.5.2. Methode

Die Verteilungs- bzw. Distributionskoeffizienten der Verbindungen wurden nach OECD Guideline for testing of chemicals<sup>58</sup> mit Hilfe der HPLC bestimmt.

Das Verfahren beruht auf der Verteilung von Substanzen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen. Dabei ist die lipophile Phase in der Regel stationär gebunden. Das Fließmittel stellt die mobile Phase dar. Die Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase führt abhängig von der Zahl theoretischer Böden zu unterschiedlichen Retentionszeiten auf der Säule, die als direktes Maß für die Lipophilie und damit für die Verteilungseigenschaften der Substanzen gelten können. Bei Ausschluss von Adsorptionsvorgängen besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Kapazitätsfaktor  $k'$ , in welchen die Retentionszeit  $t_R$  der untersuchten Verbindung und der Totzeit  $t_0$  des Systems eingehen, und deren  $\lg P$ .

Die Berechnung des Kapazitätsfaktors  $k'$  erfolgte nach der Gleichung

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

Mit Kenntnis der Systemkonstanten  $K$  und  $k'$  kann der Partition Coefficient  $P$  aus  $\lg P$  errechnet werden.

$$\lg P = \lg K + \lg k'$$

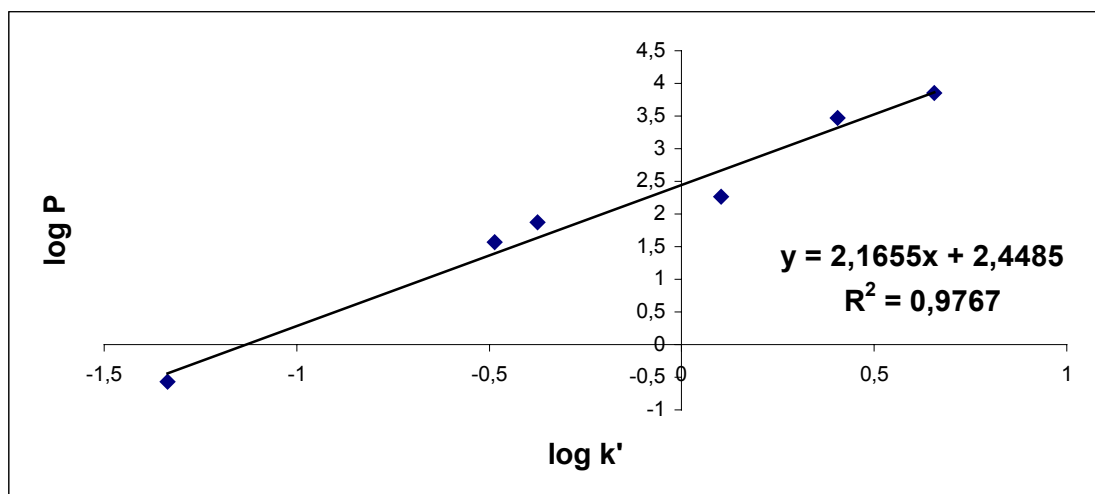
Mit Hilfe von sechs Referenzsubstanzen (Tabelle 30) wird die Systemkonstante  $K$  empirisch ermittelt. Der Verteilungskoeffizient der Verbindungen liegt im System

n-Octanol/Wasser zwischen  $-0,5$  und  $4,0$  und konnte der Literatur entnommen werden<sup>59</sup>. Die hierbei bekannten lgP-Werte wurden gegen die im System erhaltenen lgk'-Werte aufgetragen. Die Steigung der sich daraus ergebenden Kalibriergerade entspricht K.

| Substanz      | lgP<br>(n-Octanol / Wasser) |
|---------------|-----------------------------|
| Nicotinamid   | - 0,57                      |
| Phenacetin    | 1,57                        |
| Procain       | 1,87                        |
| Lidocain      | 2,26                        |
| Tetracain     | 3,47                        |
| Fomocain      | 3,85                        |
| Thioharnstoff | - 0,16                      |

**Tabelle 30** lgP-Werte der Referenzsubstanzen

Zur Bestimmung der Totzeit  $t_0$  des Systems ist ein Stoff notwendig, der keine Solvate bildet und somit auch in die Poren ( $4\mu\text{m}$ ) der stationären Phase dringen kann. Thioharnstoff erfüllt diese Bedingung und wurde daher im Versuch verwendet. Verbindungen wie Ascorbinsäure oder Acetylsalicylsäure unterliegen der Solvation und werden daher auf Grund von „Ausschlusseffekten“ vor der realen Totzeit eluiert.



**Abbildung 29** Kalibriergerade zur Bestimmung der Systemkonstante K

Der Zusammenhang zwischen P, dem Verteilungskoeffizienten im Wasser, und D, dem Distributionskoeffizienten im Puffer, ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$\lg D = \lg P + \lg \frac{1}{1 + 10^{pK_s - pH}}$$

#### 4.4.6. Bestimmung der Schmelzpunkte

##### 4.4.6.1. Geräte

|          |   |
|----------|---|
| DSC      | DSC 7, Perkin Elmer                     |
| Kryostat | Kryo RK 20 KS Lauda                     |
| Software | Pyris Software für Windows Version 1.05 |

##### 4.4.6.2. Methode

Die Bestimmung der Schmelzpunkte der Basen und Hydrochloride aller Derivate erfolgte mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetrie (DSC). Nebeneffekte dieser Methode waren die gleichzeitige Kontrolle der Reinheit der Substanzen und die Testung der Stoffe hinsichtlich polymorphen Verhaltens.

Die benötigten Substanzen wurden vor dem Schmelzen 24h im Exsikkator bei 20hPa über Phosphorpentoxid getrocknet. Für jede Messung wurde ca. 2mg benötigt.

Die Messungen erfolgten in jeweils sechs Schritten:

1. Halten der Starttemperatur (2min),
2. Erster Heizlauf (5°C/min)
3. Maximaltemperatur halten (2min)
4. Abkühlen auf Starttemperatur (10°C/min)
5. Halten der Temperatur (2min)
6. Zweiter Heizlauf (5°C/min).

In Tabelle 31 sind die verwendeten Temperaturintervalle aller Derivate zusammengefasst.

|                 | Heiz- und Kühlintervall<br>der Basen | Heiz- und Kühlintervall<br>der Hydrochloride |
|-----------------|--------------------------------------|--|
| <b>OE 5000</b>  | 20°C – 90°C                          | 20°C – 230°C                                 |
| <b>OE 500</b>   | 20°C – 90°C                          | 20°C – 230°C                                 |
| <b>Fomocain</b> | 20°C – 90°C                          | 20°C – 230°C                                 |
| <b>OE 1000</b>  | 20°C – 90°C                          | 20°C – 200°C                                 |
| <b>OE 8000</b>  | 20°C – 110°C                         | 20°C – 160°C                                 |
| <b>OE 6000</b>  | 20°C – 110°C                         | 20°C – 160°C                                 |
| <b>OE 7000</b>  | 20°C – 110°C                         | 20°C – 160°C                                 |
| <b>OE 9000</b>  | 20°C – 110°C                         | 20°C – 160°C                                 |

**Tabelle 31** Temperaturintervalle der DSC-Messungen

Die Integration der Schmelz- und Kristallisationspeaks erfolgte über die geräteeigene Software. Zur Auswertung wurden die Onsettemperatur (Wendepunkt des Peaks), die Peaktemperatur (Maximum) und die Peakfläche herangezogen. Die in Tabelle 32 aufgeführten Schmelzpunkte sind Mittelwerte aus drei Messungen.

|  | Schmelzpunkt |              |
|--|--------------|--------------|
|  | Base         | Hydrochlorid |
| <b>Morpholin als Basenkomponente</b>     |              |              |
| <b>OE 5000</b>                           | 57°C         | 221°C        |
| <b>OE 500</b>                            | 87°C         | 215°C        |
| <b>Fomocain</b>                          | 57°C         | 173°C        |
| <b>OE 1000</b>                           | 47 °C        | 166°C        |
| <b>Diethanolamin als Basenkomponente</b> |              |              |
| <b>OE 8000</b>                           | 88°C         | 112°C        |
| <b>OE 6000</b>                           | 86°C         | 135°C        |
| <b>OE 7000</b>                           | 64°C         | 120°C        |
| <b>OE 9000</b>                           | 61°C         | 143°C        |

Tabelle 32 Schmelzpunkte der untersuchten Derivate

#### 4.4.7. Bestimmung der Stabilität wässriger Lösungen von OE 7000 und OE 9000

##### 4.4.7.1. Geräte

###### 1. pH-Wert

siehe 4.6.1. (Seite 96)

###### 2. HPLC

siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen A

##### 4.4.7.2. Materialien

Die verwendeten Hydrochloride von OE 7000 und OE 9000 stammten aus eigener Herstellung im Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der FSU Jena. Sie waren HPLC-rein und besaßen einen Gehalt von 99,5%. Das Lösungsmittel wurde aus Ringer-Tabletten (Merck, Darmstadt, BRD) in destilliertem Wasser zubereitet. Bei der Einstellung der pH-Werte kamen 0,1N-HCl bzw. 0,1N-NaOH (Merck, Darmstadt, BRD) zum Einsatz.

Die benötigten Lösungsmittel für die HPLC-Analytik hatten p.A. Qualität.

#### 4.4.7.3. Methode

Wässrige Lösungen der Verbindungen OE 7000-Hydrochlorid und OE 9000-Hydrochlorid sollten hinsichtlich ihrer Stabilität unter konstanten Bedingungen (Raumtemperatur und Lichtschutz) getestet werden. Weiterhin wurden die Proben vor der Lagerung verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, um die Thermostabilität der Lösungen zu prüfen. Von OE 7000 wurden Lösungen von 1%, 2% und 5% in Ringerlösung hergestellt. Da sich in Vorversuchen abgezeichnet hatte, dass die Zubereitungen von OE 9000 eine schlechte Löslichkeit zeigten, wurde für dieses Derivat eine niedrigere Konzentrationsreihe von 0,1%, 0,5%, 1% und 2% in Ringerlösung gewählt. Alle Proben wurden auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und mit Hilfe von Rotilabo®-Spritzenfilter, 0,22µm, PVDF (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD) von Schwebeteilchen befreit. Jeweils 5ml jeder Lösung wurden wie folgt behandelt:

- Keine Wärmebehandlung oder
- 50°C, 1 h erhitzt oder
- Dampfsterilisation (125°C, 15 min)

Im Anschluss daran erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz über 100 Tage.

Außer der kontinuierlichen visuellen Begutachtung sämtlicher Proben bei horizontal einfallendem Tageslicht erfolgte eine Gehaltsbestimmung. Diese fand sofort nach der Herstellung bzw. Wärmebehandlung, und nach 72 h, 120 h, 240 h, 480 h, 1200 h, 2400 h statt. Dazu wurden 100µl jeder Probe entnommen und mit 900µl Fließmittel verdünnt. Gegebenenfalls wurde der Ansatz vorher durch Filtration über Rotilabo®-Spritzenfilter, 0,22µm, PVDF (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD) von ausgefallener Base befreit. 50µl dieser 1:10 Verdünnungen wurden mit 100µl Internem Standard und 850µl Fließmittel versetzt und anschließend nach Autoinjektion mittels HPLC analysiert.

#### 4.4.8. Bestimmung der CMC durch konzentrationsabhängige pH-Wert-Messung

##### 4.4.8.1. Geräte

siehe 4.6.1. (Seite 96)

#### 4.4.8.2. Materialien

Die Hydrochloride von Fomocain, OE 7000 und OE9000 stammten wie in den vorangegangenen Versuchen aus eigener Synthese im Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der FSU Jena. Lidocain- und Procain-HCl wurden von der Fa. Caelo (Hilden, BRD) bezogen. Als Lösungsmittel diente Aqua dest. (pH 5,8).

#### 4.4.8.3. Methode

Grundlage der Versuche war eine Veröffentlichung von THOMA<sup>52</sup>. Da die in der vorliegenden Dissertation untersuchten Derivate amphiphilen Charakter aufwiesen, war die Ermittlung der CMC als Kenngröße und zur Charakterisierung des Assoziationsverhaltens notwendig. Dazu wurde von allen Stoffen eine Konzentrationsreihe (Tabelle 33) angefertigt. Nach 24 h Lagerung im Kühlschrank, Anpassung auf Raumtemperatur und 15 min Begasung mit Stickstoff erfolgte die Ermittlung des pH-Wertes. Unter Erfassung der Messtemperatur wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

| Konz.<br>[%] | Lidocain        |                 | Procain         |                 | Fomocain        |                 | OE7000          |                 | OE9000          |                 |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|              | pH <sub>1</sub> | pH <sub>2</sub> | pH <sub>1</sub> | pH <sub>2</sub> | pH <sub>1</sub> | pH <sub>2</sub> | pH <sub>1</sub> | pH <sub>2</sub> | pH <sub>1</sub> | pH <sub>2</sub> |
| 1,6          | 4,68            | 4,69            | 5,62            | 5,60            | 4,96            | 4,98            | 5,68            | 5,74            | 5,62            | 5,60            |
| 3,0          | 4,67            | 4,64            | 5,58            | 5,57            | 4,90            | 4,88            | 5,56            | 5,56            | 5,58            | 5,57            |
| 4,0          | 4,58            | 4,54            | 5,54            | 5,51            | 4,75            | 4,75            | 5,37            | 5,38            | 5,54            | 5,51            |
| 5,0          | 4,56            | 4,52            | 5,54            | 5,51            | 4,72            | 4,73            | 5,37            | 5,37            | 5,54            | 5,51            |
| 5,6          | 4,52            | 4,51            | 5,51            | 5,51            | 4,66            | 4,65            | 5,31            | 5,29            | 5,51            | 5,51            |
| 6,4          | 4,50            | 4,50            | 5,50            | 5,45            | 4,60            | 4,59            | 5,17            | 5,18            | 5,50            | 5,45            |
| 7,2          | 4,48            | 4,48            | 5,50            | 5,48            | 4,28            | 4,29            | 5,15            | 5,14            | 5,50            | 5,48            |
| 8,0          | 4,49            | 4,49            | 5,51            | 5,47            | 4,01            | 4,00            | 4,89            | 4,91            | 5,51            | 5,47            |

Tabelle 33 Potentiometrische CMC-Bestimmung ausgewählter Derivate

### 4.5. Biopharmazeutische Untersuchungen

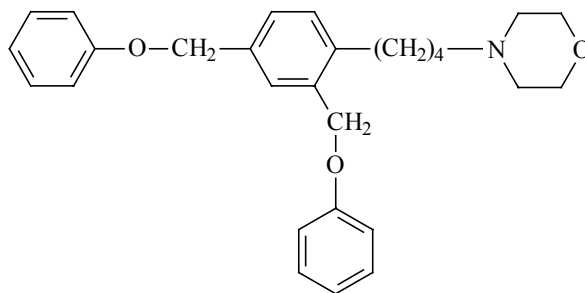
#### 4.5.1. Bestimmung der Plasmaeiweißbindung

##### 4.5.1.1. Geräte

siehe 4.7.1. (Seite 96)

#### 4.5.1.2. Materialien

Die Fomocain-Derivate, die auf ihre Bindung an Plasmaeiweiße geprüft werden sollten, waren mit Ausnahme von OE 1000 HPLC rein. OE 1000 wies 1,2% Verunreinigung in Form eines Nebenprodukts der Synthese auf. Die Untersuchung der Synthesestufe und die MS-Untersuchung der durch präparative HPLC abgetrennten Verunreinigung ergab eindeutig folgende Struktur:



**Abbildung 30** Verunreinigung im OE 1000

Aus Effizienzgründen wurde die Bestimmung der PEB mit OE 1000 unter Tolerierung der geringen Verunreinigung durchgeführt.

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel hatten p.A.- bzw. HPLC-Qualität. Das benötigte Humanserum wurde von Institut für Transfusionsmedizin der Friedrich-Schiller-Universität bereit gestellt.

#### 4.5.1.3. Methoden

##### Ultrafiltration

Es wurden Stammlösungen aus den entsprechenden Hydrochloriden in Phosphatpuffer EuAB (pH 7,4) in den benötigten Konzentrationen hergestellt.

1,0ml dieser Stammlösungen wurden mit jeweils 1,5ml Humanserum (HS) in eine Centrisart I – Filtereinheit (Fa. Sartorius) überführt, miteinander vermischt und 15 Minuten bei 20°C bis zur Gleichgewichtseinstellung stehen gelassen. Danach wurde zunächst für 2 Minuten bei 1600g und dann weitere 45 Minuten bei 2500g in einer Labofuge 200 der Fa. Heraeus mit feststehendem Winkelrotor zentrifugiert.

##### Probenvorbereitung für HPLC

Das Ultrafiltrat wurde mit Puffer (pH 10,9) alkalisiert und dreimal mit 1ml n-Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am



Rotationsverdampfer vom Solvens befreit. Der verbleibende Rückstand wurde mit 900µl HPLC-Fließmittel und 100µl Internem Standard aufgenommen. 10µl dieser Mischung wurden mit Autoinjektion auf die Säule aufgebracht und eluiert. Mit Hilfe von Kalibriergeraden der jeweiligen Verbindung wurde die in Tabelle 34 aufgeführten Ergebnisse ermittelt. Es handelt sich hierbei um Mittelwerte von mindestens fünf Messungen.

|                 | <b>Freier Arzneistoff<br/>[%]</b> | <b>Plasmaeiweißbindung<br/>[%]</b> |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| <b>OE 5000</b>  | 0,8                               | 99,2                               |
| <b>OE 500</b>   | 0,7                               | 99,3                               |
| <b>Fomocain</b> | 1,0                               | 99,0                               |
| <b>OE 1000</b>  | 1,0                               | 99,0                               |
| <b>OE 8000</b>  | 12,3                              | 87,7                               |
| <b>OE 6000</b>  | 11,9                              | 88,1                               |
| <b>OE 7000</b>  | 12,9                              | 87,1                               |
| <b>OE 9000</b>  | 8,4                               | 91,6                               |

Tabelle 34 Plasmaeiweißbindung der Derivate

#### 4.5.2. In-vitro Metabolisierung

##### 4.5.2.1. Geräte

UV/VIS      DU-640 Spektrophotometer (Beckman Instruments, USA)  
Quarzküvetten, Schichtdicke 1cm

HPLC          siehe 4.7.1. (Seite 96) Anlage und Bedingungen A

HPLC/MS      siehe 4.7.2. (Seite 97)

##### 4.5.2.2. Materialien

Mit Ausnahme von OE 1000 waren alle verwendeten Verbindungen HPLC-rein und wurden als Hydrochloride eingesetzt.

Alle benötigten Chemikalien und Lösungsmittel besaßen p.A.-Reinheit oder hatten HPLC-Qualität. Für die Inkubationsansätze wurden NADP, Glucose-6-phosphatdehydrogenase und Magnesiumchlorid (Fa. Fluka, Biochemika, Buchs, Schweiz) und Glucose-6-phosphat (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD) verwendet.

Die Herstellung des Phosphatpuffers 0,1M/l erfolgte mit 19,1g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$  (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) und 1,8g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt) auf 1000,0ml Wasser. Für die Herstellung des Tris-KCl-Puffers (pH 7,4) wurden 11,5g KCl (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) und 30,5g Tris-[(hydroxymethyl)-aminomethan] (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD) in 900ml Wasser gelöst, mittels pH-Teststreifen (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) der pH-Wert geprüft und durch tropfenweisen Zusatz von konzentrierter HCl (ca. 15ml) auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Pufferlösung zum Sieden erhitzt und nach dem Abkühlen und erneuter Überprüfung des pH-Wertes mit Wasser auf 1000,0ml aufgefüllt.

#### 4.5.2.3. Methoden

##### 4.5.2.3.1. Enzymatischer Abbau

###### Präparation der Rinderlebermikrosomen

Zur Präparation der Mikrosomensuspension (2ml Gewebefraktion entspricht durchgehend einem Äquivalent von 1g Frischleber) wurde ein frisches Rinderleberstück mit 2°C kaltem, isotonischen Tris-KCl-Puffer (pH 7,4) gewaschen und in kleine Stücke geschnitten. Dann wurde in einem, dem doppelten Lebergewicht entsprechenden Volumen Tris-KCl-Puffer, zuerst mit einem Waring® Mixer (Waring Products Division, Connecticut, USA) zerkleinert und im Anschluss daran mit einem Ultra-Turrax T25 (Janke&Kunkel, IKA®-Labortechnik) homogenisiert. Zur Gewinnung der subzellulären Mikrosomenfraktion wurde nach Abbildung 31 verfahren. Dabei kam eine Ultrazentrifuge Optima®-LE mit Festwinkelrotor 70 Ti (Beckman Instruments, USA) zum Einsatz. Die ungewaschenen Mikrosomen (M), die aus dem Sediment der Zentrifugation bei 140.000g über 80 min gewonnen worden sind, wurden in dem doppelten Volumen ihrer Auswaage entsprechendem kalten Tris-KCl-Puffer (pH 7,4) aufgeschlämmt, erneut mit einem XENOX Motorhandstück (Proxxon GmbH, Niersbach, BRD) homogenisiert und sofort verwendet.

###### Mikrosomenproteingehaltsbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgt mit der Methode Folin-Ciocalteu nach LOWRY gegen 0,01% und 0,02% Rinder-Serum-Albumin in Tris-KCl-Puffer als Standard. Die photometrische Messung wurde bei 730nm durchgeführt. Vorteil dieses

Verfahrens ist die Erfassung aller Aminosäuren durch die Kombination der Biuret-Methode (Aminosäure-Cu-Komplex; schnell, wenig empfindlich, Erfassung ab Tripeptide) und der Folin-Ciocalteu-Methode (Redoxreaktion, benötigt oxidierbare Seitenketten).

Die Bestimmung und Berechnung erfolgte mit Hilfe der Formel

$$\text{Protein in mg/g Leber} = 0,5 \times V (0,1P/S1 + 0,2P/S2)$$

V = Verdünnungsfaktor

P = Absorption der Probe

S1 = Absorption des Proteinstandards 100µg/ml

S2 = Absorption des Proteinstandards 200µg/ml

#### Cytochrom P-450 und Cytochrom b<sub>5</sub> Bestimmung

1,0ml Mikrosomensuspension wurde mit Tris-KCl-Puffer (pH 7,4) auf 10,0ml aufgefüllt. Ein Teil der Lösung wurde in eine Einmalküvette gegeben. Im Bereich von 390 – 600nm wurde zuerst der Blankwert aufgenommen und anschließend mit derselben Probe die Nulllinie aufgezeichnet. Mit NADH<sub>2</sub> (Fluka, Buchs, Schweiz) wurde die Probe reduziert, das Differenzspektrum aufgezeichnet und die Absorption bei 424nm und 470nm gemessen. Der Gehalt an Cytochrom b<sub>5</sub> berechnet sich aus  $\Delta E \text{ Cyt } b_5 = E_{424\text{nm}} - E_{470\text{nm}}$ . Zum Vergleich verschiedener Leberproben muss das Ergebnis auf den jeweiligen Proteingehalt der Probe bezogen.

In die Küvette wurde im Anschluß eine Spatelspitze festes Natriumdithionit (Merck, Darmstadt, BRD) gegeben, um alle eisenhaltigen Enzyme zu reduzieren. Damit sich der Cyt P-450-Kohlenmonoxidkomplex bilden konnte, wurde für 30 s CO eingeleitet, die Küvette verschlossen und das Spektrum aufgezeichnet. Die Messung der Absorptionen erfolgte bei 450nm und 490nm. Das Ergebnis wurde berechnet aus  $\Delta E \text{ Cyt P-450} = E_{450\text{nm}} - E_{490\text{nm}}$ .

#### Durchführung der Inkubation

Die Inkubationen wurden 30 Minuten unter Luftzutritt bei 37°C im Schüttelwasserbad (Haake SWB 20, Berlin) durchgeführt. Die Substratkonzentration der jeweiligen Hydrochloride betrug 5µMol. Die Inkubationsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

|                                    |         |              |
|------------------------------------|---------|--------------|
| 1. Substratlösung                  |         | <b>0,5ml</b> |
| OE 8000, OE 6000, OE 7000, OE 9000 |         |              |
| OE 5000, OE 500, Fomocain, OE 1000 |         |              |
| in Wasser                          |         |              |
| 2. Cofaktorlösung                  |         | <b>2,0ml</b> |
| NADP                               | 16,00mg |              |
| Glucose-6-phosphat                 | 40,0mg  |              |
| Magnesiumchloridlösung (0,1M/l)    | 1,0ml   |              |
| Phosphatpuffer pH 7,4 (0,1M/l)     | 19,0ml  |              |
| Glucose-6-phosphatdehydrogenase    | 10,0µl  |              |
| 3. Mikrosomensuspension            |         | <b>1,0ml</b> |

Für jede Verbindung wurden 3 Inkubationsansätze durchgeführt.

Unter denselben Bedingungen wurden jeweils Leerwerte ohne Substratzusatz aufgenommen, um eventuell vorhandene Störungen durch eigene Substrate der Leber zu erkennen. Um eine Abnahme der Substratkonzentration durch nichtenzymatische Reaktionen auszuschließen, wurde für jede Probe ein Blindwert mit „boiled microsomes“ (inaktive Mikrosomen, gewonnen durch 15 min Erhitzen im siedenden Wasserbad) durchgeführt.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und mit wenig festem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck, Darmstadt, BRD) auf pH 9-10 alkalisiert und mit Wasser auf 15,0ml aufgefüllt.

#### Elution, Aufarbeitung der Inkubationsansätze und Probenvorbereitung für die HPLC

Die 15ml Proben wurden komplett auf Extrelut<sup>®</sup> NT 20-Säulen (Merck, Darmstadt, BRD) gegeben und nach einer Einwirkzeit von 30min mit 40ml Diethylether (Merck, Darmstadt, BRD) eluiert. Die Eluate wurden schonend vom Solvens befreit und der Rückstand mit 2ml Fließmittel aufgenommen. 100µl dieser Lösung wurden mit 100µl Internem Standard und 800µl Fließmittel versetzt. 10µl dieser Mischung wurden mit Autoinjektion auf die Säule aufgebracht und eluiert. Mit Hilfe der Kalibriergeraden der jeweiligen Verbindung wurde die Abnahme des Substratgehalts innerhalb von 30min Inkubation berechnet und in Tabelle 34 (Seite 90) aufgeführt. Weiterhin erfolgte eine qualitative Beurteilung der Chromatogramme hinsichtlich weiterer neu registrierter Peaks als Hinweis auf Metabolite.

#### 4.5.2.3.2. Zeitlicher Verlauf des enzymatischen Abbaus von Fomocain, OE 7000 und OE 9000

Die Rinderleberpräparation, Proteingehaltsbestimmung, Cytochrom b<sub>5</sub>- und Cytochrom P-450-Bestimmung wurden wie unter 4.5.2.3. (Seite 91) beschrieben durchgeführt. Das gleiche gilt für die Durchführung der Inkubation, wobei bei diesem Versuchsansatz eine Erweiterung für die Zeit der Inkubation auf 60 min erfolgte. Der zeitliche Verlauf des enzymatischen Abbaus wurde für drei ausgewählte Substanzen studiert. Auswahlkriterien waren gute toxikologische und pharmakologische Ergebnisse sowie physiko-chemische Parameter, die für eine zukünftige neue pharmazeutische Zubereitung sprachen. Untersucht wurden OE 7000 und OE 9000. Die Muttersubstanz Fomocain, die einzige Substanz mit Morpholin als Basenkomponente, wurde als Referenz mitgeführt.

#### Elution, Aufarbeitung der Inkubationsansätze und Probenvorbereitung für HPLC

Nach der Zeit von 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten wurde jeweils ein Volumen von 0,3ml dem Inkubationsansatz entnommen, mit festem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, BRD) alkalisiert und mit 1,0ml Wasser aufgefüllt. Dann erfolgte die Aufgabe der kompletten Proben auf Extrelut<sup>®</sup> NT 3-Säulen (Merck, Darmstadt, BRD). Nach einer Einwirkzeit von 30min wurde mit jeweils 10ml Diethylether (Merck, Darmstadt, BRD) eluiert, vorsichtig vom Solvens befreit (Abdampfen des Lösungsmittels im Luftstrom bei Raumtemperatur) und der Rückstand mit 1,0ml Fließmittel aufgenommen. 600µl dieser Lösung wurden mit 100µl Internem Standard und 300µl Fließmittel versetzt. 10µl dieser Mischung wurden mit Autoinjektion auf die Säule aufgebracht und eluiert.

#### 4.5.2.3.3. HPLC/MS Bestimmung

Die während der Inkubation erhaltenen Metabolite sollten mittels HPLC/MS näher charakterisiert werden. Dafür wurden 500µl Fließmittel mit 500µl der mit 2,0ml Fließmittel aufgenommenen Eluate (siehe 4.5.2.3.1., Seite 91) gemischt und davon 20µl mit Autoinjektion auf die Säule gebracht. Elution und Detektion erfolgten unter 4.7.2. (Seite 97) angegebenen Bedingungen. Anhand der ermittelten Molmassen und der Erkenntnisse über den allgemeinen Verlauf von Biotransformationsreaktionen der Phase I konnten Hypothesen über die bei allen geprüften neuen Verbindungen entstandenen Metabolite aufgestellt werden.

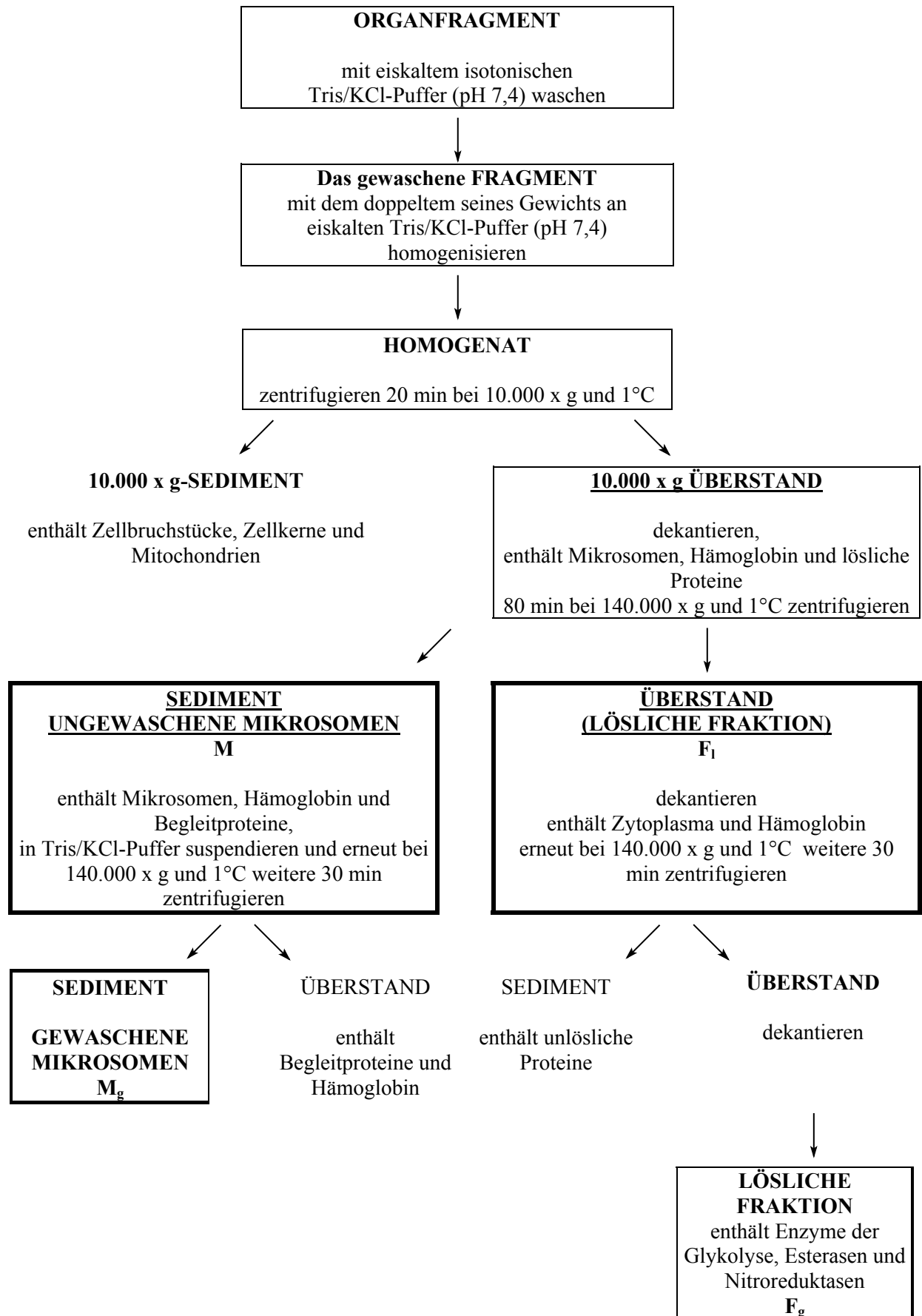


Abbildung 31 Schema zur Gewinnung der Mikrosomenfraktion

## Verwendete Geräte

### 4.6. Elektrochemische Verfahren

#### 4.6.1. Bestimmung des pH-Wertes

Messgerät: Microprozessor pH/ION Meter mM/X 3000 (WTW, Weilheim, BRD)

Elektrode: InLab<sup>®</sup> 410 (Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz) NTC  
pH 0 – 14, 0 – 100°C

#### 4.6.2. Bestimmung des pK<sub>a</sub>-Wertes

Titration: TitroLine<sup>®</sup> alpha (Fa. Schott)  
20ml Aufsatz

Elektrode: pH-Einstabmesskette Blue Line<sup>®</sup> 11 (Fa. Schott), pH 0-14, Elektrolyt 300

Software: TitriSoft<sup>®</sup> 2.0 (Fa. Schott)

### 4.7. Chromatographische Verfahren

#### 4.7.1. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

##### Anlage und Bedingungen A

HPLC-Anlage: Fa. Shimadzu (Duisburg, BRD)  
Pumpen LC 8A, Steuereinheit SCL-6B  
Autoinjektor SIL-6B  
UV-Detektor SPD-7A

stationäre Phase: LiChrospher 100-RP-18 (250 x 4mm; 100µm), Merck (Darmstadt, BRD)

mobile Phase: Acetonitril / Trifluoressigsäure 0,2%(m/V) (70/30)

Bedingungen: Flussrate: 0,7ml/min  
Detektion: 222nm  
Laufzeit: 25min  
Injektionsvolumen: 10µl

Anlage und Bedingungen B

HPLC-Anlage: Fa. Shimadzu (Duisburg, BRD)  
Pumpen LC 8A, Steuereinheit SCL-6B  
Autoinjektor SIL-6B  
UV-Detektor SPD-7A

stationäre Phase: LiChrospher 100-RP-18 (125 x 4mm; 4µm), Merck (Darmstadt, BRD)

mobile Phase: Methanol / Phosphaftpuffer pH 7,4 (75/25)

Bedingungen: Flussrate: 1,2ml/min  
Detektion: 218nm  
Laufzeit: 10min  
Injektionsvolumen: 10µl

**4.7.2. Hochdruckflüssigchromatographie-Massenspektroskopie (HPLC-MS)**

HPLC/MS HPLC: Autoinjektor; Hewlett Packard Series 1100  
Säule: LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP18, (250 x 4mm, 100µm), (Merck, Darmstadt)

MS PE SCIEX<sup>®</sup> API 165 (Toronto, Canada)



Die derzeit gebräuchlichsten Lokalanästhetika (LA) sind schwache Basen vom Amid- oder Estertyp. Die einzige Ausnahme bildet das stickstofffreie Polydocanol. In Abhängigkeit von ihren Eigenschaften werden die LA zur Oberflächen-, Infiltrations- und Leitungsanästhesie sowie zur intravenösen Regionalanästhesie der Extremitäten verwendet. Die Entwicklung neuer Verbindungen wird ausgelöst durch nachteilig empfundene Nebenwirkungen. Dazu zählen neben systemischen Erscheinungen besonders die allergischen Reaktionen, welche vorwiegend bei LA des Estertyps auftreten. Diese Reaktionen können bis zum anaphylaktischen Schock führen. Für Fomocain (4-[3-(4-Phenoxyethylphenyl)-propyl]-morpholin), das einzige LA mit der chemischen Struktur eines basischen Ethers, sind keine Sensibilisierungsreaktionen beschrieben. Die Substanz stand bisher zur topischen Applikation in Form von Externa zur Verfügung.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oelschläger wurde während der letzten Jahre die Molekülstruktur des Fomocain vielfältig verändert, wobei Verbindungen mit anderen Wirkungsschwerpunkten (z.B. Antiarrhythmika) oder anderen chemischen Eigenschaften (z.B. bessere Wasserlöslichkeit) angestrebt wurden. Durch gezielte Synthese gelang erstmalig die Herstellung von chiralen Fomocainen. Diese sollen hinsichtlich ihrer Wirkung auch an Rezeptoren getestet werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den Möglichkeiten, die Muttersubstanz Fomocain chemisch oder galenisch so zu modifizieren, dass erstmalig eine parenteral applizierbare Zubereitung zur Verfügung gestellt werden kann. Weiterhin wurden sieben in der Arbeitsgruppe dargestellte Derivate, drei mit Morpholin- und vier mit Diethanolamin-Resten bei verschiedenen Zwischenkettenlängen, auf ihre Eignung als möglicher Fomocainersatz getestet. Dabei stand die Erfassung aller physiko-chemischen und pharmakologisch-toxikologischen Parameter im Vordergrund. Zwei Derivate wurden in ihrer Lösung und in einer Zubereitungsart genauer charakterisiert.

## 1. Fomocain

Das ursprüngliche Ziel, durch einen einfachen technologischen Vorgang ein gut wasserlösliches Derivat zu erhalten, wurde leider nicht erreicht, da 1- bis 2%ige Lösungen von Fomocain-HCl nach einiger Zeit bei RT einen Teil der Base ausscheiden und bei Erhöhung des pH-Wertes auf 7,4 die Base vollständig ausfällt (Trübungs-pH: 5,70, Wasserlöslichkeit der Base:  $8,7\mu\text{g/ml} = 0,028\text{mmol/l}$ ). Daher wurde zunächst versucht, zur Herstellung von pharmakologisch geeigneten Lösungen andere Säuren zur Salzbildung zu verwenden. Es wurden 2 anorganische, 28 organische Säuren darunter 9 Aminosäuren

getestet. Der Säurezusatz erfolgte dabei in äquimolarer Menge und in Abhängigkeit von der Zahl der Säurefunktionen auch in halb- bzw. drittmolarer Konzentration. Lediglich mit äquimolar zugesetzter L-Asparaginsäure konnte für pH 7,03 eine Fomocain-Konzentration von  $41,21\mu\text{g/ml} = 0,132\text{mmol/}$  erreicht werden. Dies entspricht einer verbesserten Löslichkeit um den Faktor 4,7. Die Verwendung von L-Asparaginsäure führt allerdings nicht nur zur Bildung des Aspartatsalzes des Fomocain sondern verändert auch die Pufferkapazität der Lösung. Dies trifft auch für alle anderen geprüften Säuren zu.

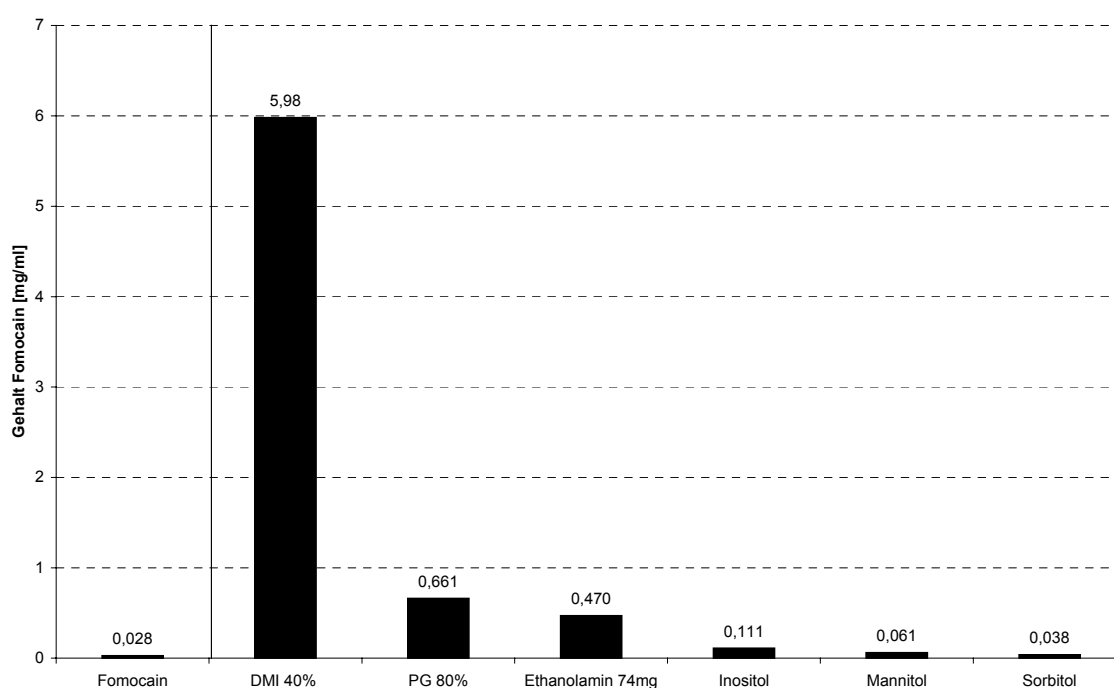
Eine weitere Möglichkeit der Bereitung einer hochprozentigen Fomocain-Lösung bestand in der Bildung einer sogenannten Mischmizelle aus Fomocain-Base und Fomocain-HCl. Dabei kamen drei verschiedene Darstellungsstrategien zum Einsatz. 1. Es wurden Verreibungen aus Base und Hydrochlorid in unterschiedlichen Verhältnissen angefertigt und diese jeweils in Ringer-Lösung, isotonischer Kochsalzlösung bzw. in destilliertem Wasser gelöst. 2. Weiterhin erfolgte das Umkristallisieren der 1:1 Verreibungen Base und Salz aus Aceton, Acetonitril, THF und Methanol und anschließendes Lösen in oben genannten wässrigen Lösungsmitteln. 3. Es wurden Stammlösungen von Fomocain-HCl (wässrig) und Fomocain-Base (organisch, Aceton) zubereitet und die Mischungen der beiden durch Variation der Hydrochlorid-Base-Verhältnisse und der pH-Werte geändert. In dieser Versuchsreihe gab es allerdings keinen nennenswerten Erfolg. Alle angewandten Methoden erbrachten nicht die gewünschte Konzentrationserhöhung des LA.

Eine in der Galenik häufig angewandte Methode, um schwer lösliche Stoffe in Lösung zu bringen oder zu halten, ist die Verwendung von Lösungsvermittlern. Dabei kommen vorwiegend Alkohole zum Einsatz. Die Anforderungen an den Hilfsstoff Lösungsvermittler sind vor allem pharmakologische Unbedenklichkeit und kein Auftreten von Inkompatibilitäten mit dem Arzneistoff. Die geprüften Lösungsvermittler sind mit ihren Konzentrationen in Tabelle 35 aufgeführt. Vorversuche mit Ethanol, dem gebräuchlichsten Alkohol, zeigten unbefriedigende Ergebnisse und wurden abgebrochen.

| Lösungsvermittler     | Verwendete Konzentrationen   |
|-----------------------|------------------------------|
| Mannitol              | 4,5% (m/V)                   |
| Sorbitol              | 4,5% (m/V)                   |
| Inositol              | 4,5% (m/V)                   |
| Nicotinamid           | 0,12%, 1,22% (m/V)           |
| Glycerol              | 35%, 80% (m/V)               |
| Propylenglycol        | 2,5%, 35%, 80% (m/V)         |
| Ethanolamin           | 0,6%, 1,2% (m/V)             |
| Dimethylisorbid (DMI) | 5%, 10%, 20%, 30%, 40% (V/V) |

**Tabelle 35** Verwendete Lösungsvermittler mit Konzentrationen

Der Einsatz der Lösungsvermittler (Tabelle 35, Seite 99) erbrachte günstigere Ergebnisse als bei der Salzbildung. Hervorzuheben sind die erreichten Konzentrationen mit drei Lösungsvermittlern: Ethanolamin (74mg)  $470\mu\text{g/ml} = 1,51\text{mmol/l}$  Fomocain (pH 7,23), Propylenglycol (80% m/V)  $660,71\mu\text{g/ml} = 2,12\text{mmol/l}$  Fomocain (pH 7,00) und Dimethylisosorbid (40% V/V)  $5,98\text{mg/ml} = 19,2\text{mmol/l}$  Fomocain (pH 7,32). Die Steigerung der erreichten Fomocain-Konzentrationen ist dabei beträchtlich. Trotzdem bestanden bei den neuen Formulierungen Bedenken. Die Zubereitungen mit Ethanolamin und DMI waren nicht langzeitstabil und außerdem stark lichtanfällig (Verfärbung). Die Mischung mit Propylenglycol wies eine hohe Viskosität auf. Für eine propylenglycolhaltige Lösung von Etomidate sind Schmerzen<sup>45</sup> beim Einstich, Nekrosen<sup>45</sup> und hämolytische Reaktionen<sup>45</sup> beschrieben. Daher wurde auf pharmakologisch-toxikologische Prüfungen der Lösungen mit PG verzichtet. Abbildung 32 veranschaulicht eindrucksvoll die Löslichkeitsverbesserung mit DMI um den Faktor 210.

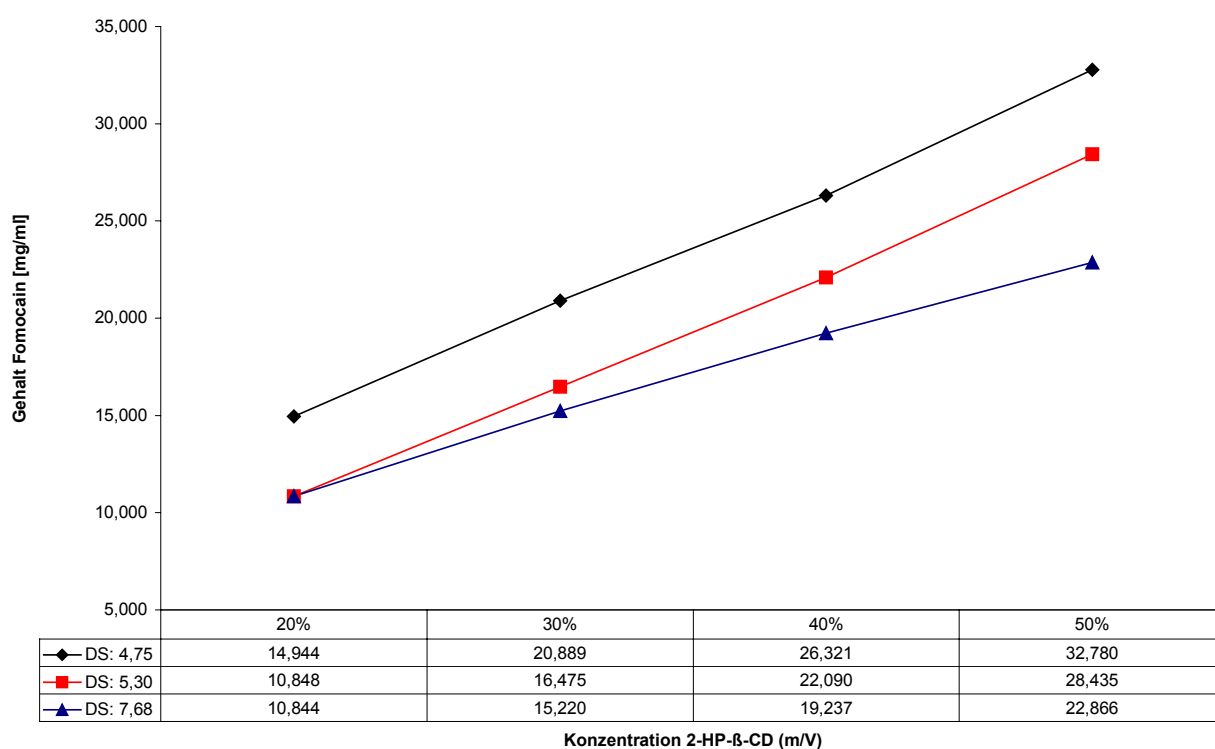


**Abbildung 32** Zusammenfassung der Lösungsvermittler und Vergleich mit max. Löslichkeit des Fomocain

Einen neuen Ansatz zur Lösung des Problems bot sich mit der Herstellung von Einschlussverbindungen mit Cyclodextrinen. Untersuchungen von EV sind mit LA anderer chemischer Struktur bisher nicht durchgeführt wurden. Ein möglicher Grund dafür dürfte sein, dass sich das Löslichkeitsproblem bei basischen Estern und Amiden nicht stellt. Erste

Untersuchungen mit den natürlichen Cyclodextrinen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD ergaben, dass lediglich  $\beta$ -CD in der Lage ist, eine hohe Konzentration Fomocain einzuschließen. Da  $\beta$ -CD durch eine verhältnismäßig schlechte Wasserlöslichkeit (Tabelle 1) gekennzeichnet ist und dadurch bedingt toxische Nebenwirkungen durch Auskristallisation, besonders in der Niere<sup>24</sup>, beschrieben worden sind, wurde nach intensiver Recherche 2-HP- $\beta$ -CD als Alternative ausgewählt. Es handelt sich hierbei um ein Derivat des  $\beta$ -CD mit 2-Hydroxypropyl-Substituenten, das sich durch eine sehr gute Wasserlöslichkeit ( $>50\text{g}/100\text{ml}$ ) auszeichnet und das praktisch atoxisch ( $\text{LD}_{50} = 10\text{g}/\text{kg}$  Maus) ist. Mit 2-HP- $\beta$ -CD konnte eine Lösung hergestellt werden, die eine reproduzierbare Konzentration von  $41,17\text{mg}/\text{ml} = 132,2\text{mmol}/\text{l}$  Fomocain ( $\text{pH } 7,40$ ) enthielt. Dies entspricht dem 4700fachen der maximalen Wasserlöslichkeit der Base. Die Zubereitung ist nach Wärmebehandlung (Dampfsterilisation oder  $50^\circ\text{C}/1\text{h}$ ) bei RT-Lagerung und unter Lichtschutz stabil. Es traten weder eine pH-Verschiebung noch eine Auskristallisation der Base ein. Um die Lösung vor mikrobiellem Befall zu schützen, wurde sie nach EuAB im Endbehältnis sterilisiert (Dampfsterilisation,  $121^\circ\text{C}$ , 15 min). Eine im Anschluss daran durchgeführte Gehaltskontrolle ergab die Ausgangskonzentration an Fomocain und keinen Hinweis auf Spaltprodukte, z.B. Phenolbildungen, wie sie bei Fomocain-Formulierungen im sauren pH-Bereich auftreten. Für die entstandene EV wurde ein Fomocain:2-HP- $\beta$ -CD -Verhältnis von 1:1 ermittelt. Durch Molecular Modelling wurde herausgefunden, dass sich dabei der mittlere Phenylring des Moleküls in der 2-HP- $\beta$ -CD-Kavität von  $0,78\text{nm}$  befindet (Abbildung 13, Seite 34). Die Bindungskonstante der EV wurde rechnerisch ( $1267,7 \text{ M}^{-1}$ ), mittels Titration ( $1360 \text{ M}^{-1}$ ) und mit Kapillarelektrophorese ( $638,5 \text{ M}^{-1}$ ) ermittelt. Die gefundenen absoluten Werte sind dabei, bedingt durch die verschiedenen Messmethoden, nicht vergleichbar. Es können lediglich vergleichende allgemeine Aussagen angestellt und Tendenzen zwischen verschiedenen Derivaten (siehe 3.1.3. Seite 30 und s.u.) festgestellt werden. Fomocain ist in seiner EV nur schwach gebunden. Das heißt, es kann aus der EV schnell freigesetzt werden. Eine Latenzzeit, verursacht durch einen starken CD-Stoff-Komplex, wie sie für verschiedene andere Arzneistoffe beobachtet wurde, war also nicht zu erwarten. Auf die In vitro-Kinetik und die PEB des Fomocain konnte kein bzw. nur ein geringer Effekt durch den Einsatz des 2-HP- $\beta$ -CD festgestellt werden. Es wurden nach der Inkubation mit Rinderlebermikrosomenhomogenat keine neuen Metabolite bzw. Konzentrationsänderungen der Metaboliten gefunden werden. Die PEB sinkt von 99,0% auf 95,1%.

Für die Ermittlung der maximal möglichen Fomocain-Konzentration wurden weiterhin verschieden substituierte 2-HP- $\beta$ -CD synthetisiert und getestet. Die Synthesen wurden nach J. PITHA et al.<sup>53</sup> durchgeführt. Die Substitutionsgrade der Produkte lagen bei 4,75, 5,30 und 7,68 und waren mittels MS-ESI und NMR überprüft worden. Sie waren frei von Aceton und hochpolymeren Propylenglycolen. Es ist bekannt, dass sich mit steigendem Substitutionsgrad (DS) die lösungsvermittelnden Eigenschaften der Cyclodextrine<sup>53</sup> verringern. Dieser Effekt konnte auch in dieser Versuchsreihe bestätigt werden. Über den gesamten verwendeten Konzentrationsbereich zeigt 2-HP- $\beta$ -CD mit DS: 4,75 das beste Lösungsvermögen für Fomocain (Abbildung. 33).



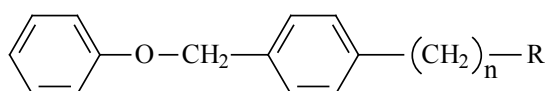
**Abbildung 33** Einfluss des Substitutionsgrades auf die Fomocain-Konzentration

Die erreichte Konzentration an Fomocain in den EV mit selbst gefertigtem CD lag mit 32,78mg/ml = 105mmol/l unter dem in mehreren Ansätzen mit kommerziell erhältlichem 2-HP- $\beta$ -CD DS: 5,10 erreichten Gehalt von 41mg/ml = 132mmol/l. Da in dieser Versuchsreihe nur eine Tendenz getestet werden sollte, wurde auf eine Ursachenanalyse des Konzentrationsunterschiedes verzichtet.

Eine weitere Steigerung des Fomocaingehaltes durch den Zusatz von Wasserstrukturbrechern (Nicotinamid, Harnstoff) oder –bildnern (Sorbitol) zum CD war nicht möglich.

### 3. Fomocain-Derivate

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Löslichkeit bestand in der chemischen Veränderung der Ausgangssubstanz Fomocain. Durch Variation der Alkylkettenlänge von C1 bis C4 sowie einem Austausch des Morpholin-Restes gegen Bis-[2-hydroxy-ethyl]-amin entstanden sieben neue Derivate. Die von OELSCHLÄGER et al. synthetisierten Verbindungen wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals in ihren Eigenschaften von mir umfassend charakterisiert. In Tabelle 36 sind alle relevanten Parameter sämtlicher getesteter Substanzen inklusive der Muttersubstanz Fomocain zusammengestellt.



| Derivat | pK <sub>a</sub> -Wert | logP | logD (pH 7,40) | Trübungs-pH-Wert | Wasserlöslichkeit der Base [mmol/l] | PEB |
|---------|-----------------------|------|----------------|------------------|-------------------------------------|-----|
|---------|-----------------------|------|----------------|------------------|-------------------------------------|-----|

#### R = Morpholin als Basenkomponente

|                         |      |      |      |      |        |      |
|-------------------------|------|------|------|------|--------|------|
| OE 5000 ( <i>n</i> =1)  | 6,86 | 3,49 | 3,38 | 5,37 | 0,0313 | 99,2 |
| OE 500 ( <i>n</i> =2)   | 6,85 | 3,65 | 3,54 | 5,50 | 0,0428 | 99,3 |
| Fomocain ( <i>n</i> =3) | 7,24 | 3,87 | 3,64 | 5,70 | 0,0280 | 99,0 |
| OE 1000 ( <i>n</i> =4)  | 7,23 | 4,20 | 3,98 | 5,13 | 0,0079 | 99,0 |

#### R = Diethanolamin als Basenkomponente

|                        |      |      |      |      |        |      |
|------------------------|------|------|------|------|--------|------|
| OE 8000 ( <i>n</i> =1) | 7,62 | 2,43 | 2,01 | 7,09 | 0,2279 | 87,7 |
| OE 6000 ( <i>n</i> =2) | 7,94 | 2,58 | 1,93 | 7,16 | 0,1423 | 88,0 |
| OE 7000 ( <i>n</i> =3) | 8,55 | 2,77 | 1,59 | 7,67 | 0,1341 | 87,1 |
| OE 9000 ( <i>n</i> =4) | 8,37 | 3,02 | 2,01 | 7,49 | 0,1165 | 91,6 |

**Tabelle 36** Zusammenfassung wichtiger Parameter aller untersuchter Derivate

Die Verlängerung der Alkylenkette unter Beibehaltung des Morpholin-Restes führt zu Derivaten, die hinsichtlich der Wasserlöslichkeit keinen Vorteil bringen. Mit Ausnahme des Fomocain, welches immer als Referenz diente, wurde keine dieser Substanzen in weiterführende Prüfungen einbezogen.

Durch den Austausch des Morpholin-Restes gegen Bis-[2-hydroxy-ethyl]-amin (Diethanolamin-Rest) entstanden hingegen Derivate, die sich durch eine sehr gute Wasserlöslichkeit und günstigere physiko-chemische Parameter auszeichnen. OE 7000 und OE 9000 wurden auf Grund sehr guter pharmakologischer Befunde in ihren Lösungen und in einer Zubereitung mit 2-HP-β-CD näher untersucht.

Von OE 7000 (4-[3-(4-Phenoxymethylphenyl)-propyl]-diethanolamin), dem direkten Analogon des Fomocain, war es problemlos möglich, eine klare Lösung von neutralen pH-Wert mit einem Gehalt von 50mg/ml = 151,9mmol/l herzustellen. Die Zubereitung war autoklavierbar. Über den Lagerzeitraum von einem Jahr bei RT und Lichtschutz trat keine Präzipitation oder Zersetzung der Substanz auf. Als Folge des amphoteren Charakters der Verbindung, lag die Wahrscheinlichkeit nahe, dass es in Lösung zur Bildung von Mizellen oder anderen Assoziaten kommen kann. Mit den Methoden der Lichtstreuung, des Gefrierbruchs und der NMR gelang es, das Verhalten von OE 7000 in Wasser zu analysieren. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von 0,01% bis 10% untersucht. Die Befunde mit den drei genutzten Methoden waren dabei deckungsgleich. Während in den kleinen Konzentrationsbereichen eine mittlere Teilchengröße gefunden wurde, waren im Bereich zwischen 0,5 und 2,5% zwei verschiedene Verteilungen nachweisbar. Die Tendenz zur Ausbildung größerer Assoziate stieg dabei in gleichem Maße wie die Konzentration. Der Gehalt von 2,5% ist im NMR durch vollständige Signalentkopplung und größte Verschiebung gekennzeichnet. Die Zubereitungen zwischen 5 bis 10% wiesen wieder nur Teilchen der Größe der Monomere (2-3nm) auf. Die CMC, welche potentiometrisch ermittelt wurde, lag bei 0,6008g/100ml. Eine Assoziatbildung ist demzufolge gegeben. Die Befunde sind allerdings schlecht erklärbar und auf Grund der Stabilität der Zubereitungen und verhältnismäßig kleinen Teilchengrößen von geringer praktischer Relevanz.

Die Substanz OE 9000 (4-[3-(4-Phenoxymethylphenyl)-butyl]-diethanolamin) zeichnet sich trotz der längeren Alkylkette durch eine sehr gute Wasserlöslichkeit aus. Eine klare, pH-neutrale Zubereitung von 50mg/ml = 145,8mmol/l ist herstellbar und 1 h stabil. Durch äußere Einflüsse (Licht, Luft) setzt die Präzipitation der Basen ein. Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass die Grenzkonzentration für langzeitstabile Lösungen bei 5mg/ml = 14,6mmol/l liegt. Auf Grund der chemischen Struktur findet auch bei dieser Verbindung die Bildung von Assoziaten statt. Die CMC liegt bei 0,6008mg/100ml. Außergewöhnliche Befunde, wie sie bei OE 7000 auftraten, wurden nicht ermittelt und sind für stabile Lösungen <5mg/ml nicht relevant.

Sowohl OE 7000 als auch OE 9000 sind problemlos in gleicher Konzentration (40mg/ml) wie Fomocain in 2-HP- $\beta$ -CD einarbeitbar. Es entstehen klare, hochviskose Lösungen mit dem pH-Wert 7,40. Die Zubereitungen sind autoklavierbar und stabil über den geprüften Lagerzeitraum von einem Jahr bei RT. Wie für die Muttersubstanz wurde ein Substanz: 2-

HP- $\beta$ -CD-Verhältnis von 1:1 ermittelt. Die mit verschiedenen Methoden erhobenen Bindungskonstanten sind in Tabelle 37 zusammengefasst. Es wird ersichtlich, dass bei

|                  | <b>Fomocain</b>       | <b>OE 7000</b>         | <b>OE 9000</b>         |
|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Titration</b> | 1360 M <sup>-1</sup>  | 1570 M <sup>-1</sup>   | 2270 M <sup>-1</sup>   |
| <b>CE</b>        | 638,5 M <sup>-1</sup> | 1136,2 M <sup>-1</sup> | 1269,2 M <sup>-1</sup> |

**Tabelle 37** Verschieden ermittelte Bindungskonstanten für Fomocain, OE 7000 und OE 9000

allgemein schwacher Bindung im Komplex OE 9000 die stärkste Affinität zum CD zeigt. Die Absolutwerte der beiden Verfahren können dabei nicht verglichen werden.

Die in-vitro Metabolisierung und die Plasmaeiweißbindung bleiben durch den CD-Zusatz unbeeinflusst.

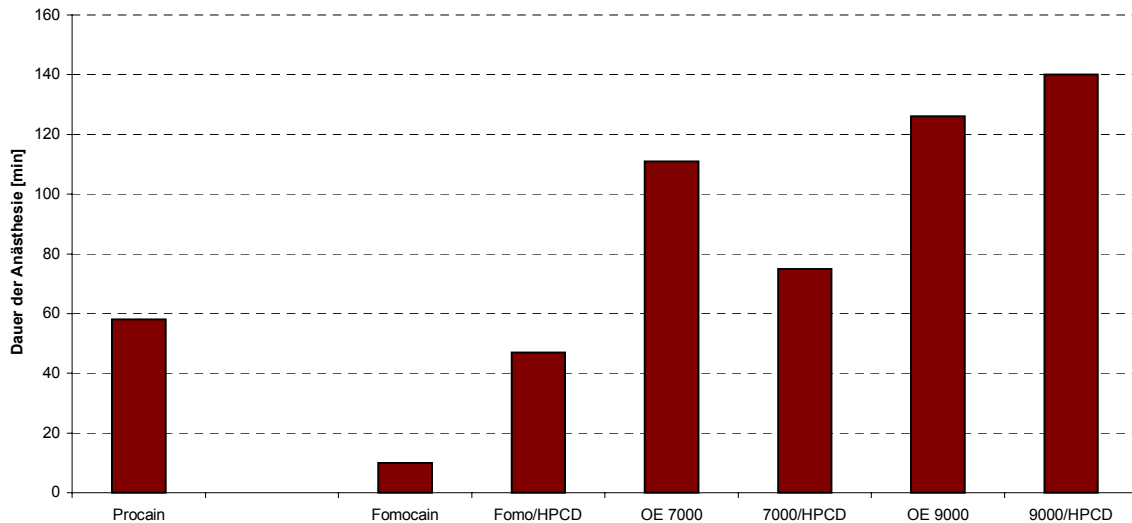
Während für OE 7000 eine Einbettung in 2-HP- $\beta$ -CD aus technologischer Sicht nicht notwendig erscheint, stellt diese Zubereitung für OE 9000 eine Alternative dar, um eine wirksame Konzentration über einen langen Zeitraum in Lösung zu halten. Weiterhin besteht für alle drei Verbindungen in der Cyclodextrinzubereitung die Möglichkeit der Lyophilisation. Das dabei entstehende Pulver ist stabil und dürfte kaum mikrobiell anfällig sein. Durch Zugabe von Wasser ist die Zubereitung in gewünschten Konzentrationen und Mengen sofort herstellbar.

#### 4. Pharmakologisch-toxikologische Parameter

Die pharmakologisch-toxikologischen Untersuchungen wurden mit allen acht Derivaten<sup>60</sup>,<sup>61</sup> sowie den Zubereitungen von Fomocain, OE 7000 und OE 9000 in 2-HP- $\beta$ -CD durchgeführt. Als Referenzsubstanzen dienten Procain und Tetracain. Um Effekte zu erkennen, welche durch das CD hervorgerufen werden, erfolgte ebenfalls die Testung einer Lösung von 50% (m/V) 2-HP- $\beta$ -CD.

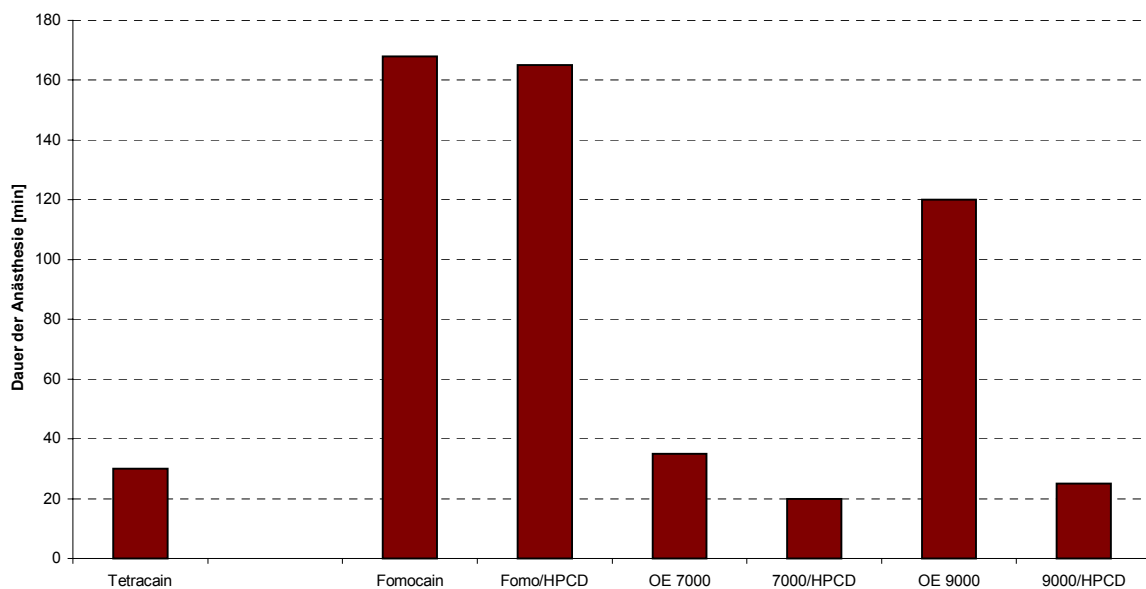
Alle Vergleichssubstanzen und -zubereitungen sind gegenüber Fomocain, das nur schwach ausgeprägte leitungsanästhetische Eigenschaften besitzt, hier deutlich wirksamer. 2-HP- $\beta$ -CD zeigte keine Wirkung. Durch die Einbettung des Fomocain in 2-HP- $\beta$ -CD steigt die Wirkung um den Faktor 8. Die Diethanolamin-Derivate erfahren keine oder nur geringe Wirkungsverstärkung durch den cyclodextrinhaltigen Zusatz (Abbildung 34).





**Abbildung 34** Leitungsanästhesie einer 1%igen Lösung (N. ischiadicus)

Die sehr gut oberflächenanästhesierende Substanz Fomocain wird in ihren pharmakologischen Eigenschaften von ihrer Zubereitung in 2-HP- $\beta$ -CD und OE 9000 lediglich in geringen Konzentrationsbereichen übertroffen. Ab 1% ist die Ausgangsverbindung allen anderen Derivaten überlegen. Der Zusatz von 2-HP- $\beta$ -CD hat für alle Substanzen einen Wirkverlust hinsichtlich der Oberflächenanästhesie zur Folge (Abbildung 35).



**Abbildung 35** Oberflächenanästhesie einer 1% Lösung (Cornea Ratte)

Zur Charakterisierung der Derivate und ihrer Zubereitungen hinsichtlich der toxikologischen Eigenschaften wurden der approximative  $LD_{50}$ -Wert ermittelt (Abbildung 36) und die Parese am Nervus ischiadicus der Ratte getestet (Abbildung 37).

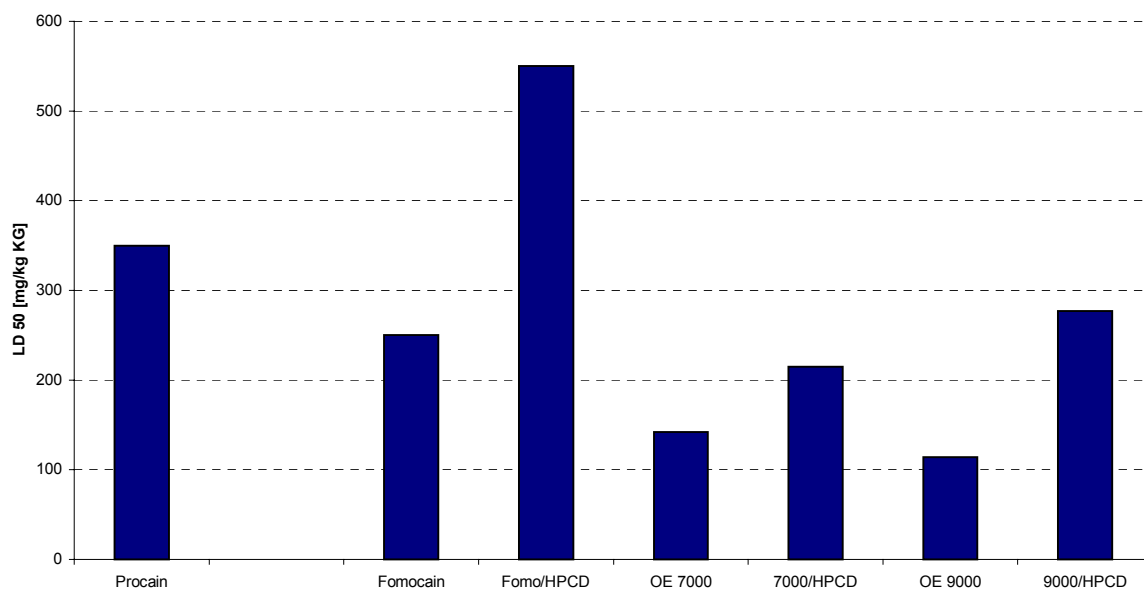


Abbildung 36  $LD_{50}$ -Werte

Allgemein geht bei den geprüften Verbindungen eine stärkere Wirkung mit einer Verminderung der Toxizität einher. Der Zusatz von 2-HP- $\beta$ -CD bewirkt überraschend eine signifikante Verbesserung der Toxizitätsdaten. Die Parese wurde deutlich verkürzt und tritt bei OE 7000 und OE 9000 erst bei Konzentrationen  $>1,5\%$  auf und ist verglichen mit Fomocain verlängert.

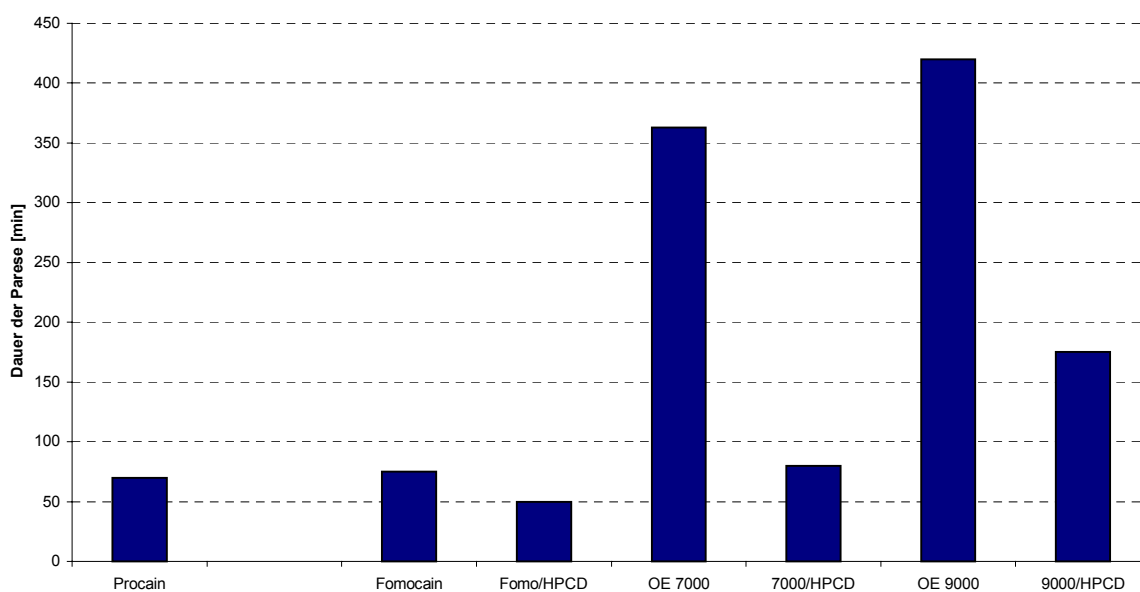


Abbildung 37 Dauer der Parese des N. Ischiadicus durch eine 2%ige Lösung

Zusammenfassend gilt, dass es in der vorliegenden Arbeit gelungen ist, erstmals eine hochkonzentrierte, stabile, parenteral applizierbare Lösung von Fomocain herzustellen. Erreicht wurden die verbesserten toxikologischen Befunde bei gleicher Oberflächenanästhesie und deutlich stärkerer Leitungsanästhesie durch den Zusatz von 2-HP- $\beta$ -CD. Durch chemische Modifikation des Moleküls stehen mit OE 7000 und OE 9000 zwei weitere sehr gut wasserlösliche Derivate zur Verfügung, deren Einsatz, mit oder ohne das Hilfsstoff 2-HP- $\beta$ -CD, als Lokalanästhetika möglich ist. Die Zubereitungen aller drei Substanzen sind umfassend charakterisiert worden. Weitere Prüfungen werden über mögliche Applikationswege entscheiden.

|  |    |
|--|----|
| <b>Abb. 1</b> Charakteristika von Nervenfasern.....  | 4  |
| <b>Abb. 2</b> Grundstruktur der LA nach Löfgren .....  | 5  |
| <b>Abb. 3</b> Schematischer und molekularer Wirkmechanismus von Lokalanästhetika .....   | 6  |
| <b>Abb. 4</b> Struktur und Größe von $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Cyclodextrin.....   | 10 |
| <b>Abb. 5</b> Cyclodextrin EV mit verschiedenen host-guest Verhältnissen.....  | 10 |
| <b>Abb. 6</b> Struktur von $\beta$ -CD mit 2-, 3- und 6-Hydroxylgruppe der Glucopyranoseeinheit....  | 16 |
| <b>Abb. 7</b> Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin.....  | 17 |
| <b>Abb. 8</b> Tensidmoleküle und Mizellbildung (schematisch) .....   | 20 |
| <b>Abb. 9</b> Abhängigkeit der Fomocain-Konz. von der Menge Lösungsvermittler DMI .....  | 24 |
| <b>Abb. 10</b> Max. Löslichkeit von Fomocain in Abhängigkeit von der 2-HP- $\beta$ -CD Konz. ....  | 26 |
| <b>Abb. 11</b> Einfluss des Substitutionsgrades auf die Fomocain-Einbettung .....  | 28 |
| <b>Abb. 12</b> Einfluss von Wasserstrukturbrechern und -bildnern auf die Fomocain-EV .....   | 30 |
| <b>Abb. 13</b> Modell des Fomocain- $\beta$ -CD-Komplexes .....  | 34 |
| <b>Abb. 14</b> Vergleich der Pharm.-tox. Daten von Fomocain und der Fomocain-2-HP- $\beta$ -CD-<br>Zubereitung .....                         | 39 |
| <b>Abb. 15</b> Centrisart® I Filtereinheit Fa. Sartorius.....  | 47 |
| <b>Abb. 16</b> OE 7000 - HPLC-MS ESI Spektrometrie nach Inkubation im Rinderleberzell-<br>homogenat .....                                    | 49 |
| <b>Abb. 17</b> Fomocain - HPLC-MS ESI Spektrometrie nach Inkubation im Rinderleberzell-<br>homogenat .....                                   | 50 |
| <b>Abb. 18</b> Bestimmung der CMC von Fomocain, OE 7000, OE 9000 und Procain durch<br>konzentrationsabhängige pH-Wert-Messung.....           | 52 |
| <b>Abb. 19</b> NMR-spektrometrische Untersuchungen zur Assoziatbildung von OE 7000 in<br>wässriger Lösung .....                              | 53 |
| <b>Abb. 20</b> HPLC-Chromatogramm nach Etherspaltung (Vergleichssubstanz).....   | 54 |
| <b>Abb. 21</b> HPLC-Chromatogramm von OE 7000 bei pH 1,6 und nach Erwärmung.....   | 54 |
| <b>Abb. 22</b> Stabilität der wässrigen OE 9000 Zubereitung in unterschiedlichen Konz.....   | 55 |
| <b>Abb. 23</b> Zeitlicher Verlauf des enzym. Abbaus von Fomocain, OE 7000 und OE 9000 ...  | 56 |
| <b>Abb. 24</b> Vergleich der pharm.-tox. Parameter von OE 7000, OE 9000 und ihrer 2-HP- $\beta$ -<br>CD-Zubereitungen in 2%iger Lösung ..... | 59 |
| <b>Abb. 25</b> MS-ESI Spektren von 2-HP- $\beta$ -CD (DS:5,1, DS: 6,8, DS:7,2).....  | 69 |
| <b>Abb. 26</b> IR-Spektrum 2-HP- $\beta$ -CD, Eigensynthese DS 5,1 .....   | 71 |
| <b>Abb. 27</b> IR-Spektrum 2-HP- $\beta$ -CD, Eigensynthese DS 6,8 .....   | 71 |
| <b>Abb. 28</b> IR-Spektrum 2-HP- $\beta$ -CD, Eigensynthese DS 7,2 .....   | 71 |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>Abb. 29</b> Kalibriergerade zur Bestimmung der Systemkonstanten K .....                                    | <b>84</b>  |
| <b>Abb. 30</b> Verunreinigung im OE 1000 .....  | <b>89</b>  |
| <b>Abb. 31</b> Schema zur Gewinnung der Mikrosomenfraktion .....  | <b>95</b>  |
| <b>Abb. 32</b> Zusammenfassung der Lösungsvermittler und Vergleich mit max. Löslichkeit des<br>Fomocain ..... | <b>100</b> |
| <b>Abb. 33</b> Einfluß des Substitutionsgrades auf die Fomocain-Konzentration .....                           | <b>102</b> |
| <b>Abb. 34</b> Leitungsanästhesie einer 1%igen Lösung (N. ischiadicus) .....                                  | <b>106</b> |
| <b>Abb. 35</b> Oberflächenanästhesie einer 1%igen Lösung (Cornea Ratte) .....                                 | <b>106</b> |
| <b>Abb. 36</b> LD <sub>50</sub> -Werte .....  | <b>107</b> |
| <b>Abb. 37</b> Dauer der Parese des N. Ischiadicus durch eine 2%igen Lösung .....                             | <b>107</b> |

|                   |  |           |
|-------------------|--|-----------|
| <b>Tabelle 1</b>  | Wasserlöslichkeit ausgewählter CD-Derivate .....   | <b>11</b> |
| <b>Tabelle 2</b>  | LD <sub>50</sub> -Werte der Cyclodextrine .....  | <b>12</b> |
| <b>Tabelle 3</b>  | Cyclodextrinhaltige Fertigarzneimittel mit Dosierung .....                               | <b>13</b> |
| <b>Tabelle 4</b>  | Löslichkeit verschiedener Arzneistoffe in Wasser, $\beta$ -CD und 2-HP- $\beta$ -CD..... | <b>14</b> |
| <b>Tabelle 5</b>  | Chemische Struktur ausgewählter Cyclodextrin-Derivate.....                               | <b>15</b> |
| <b>Tabelle 6</b>  | Lösungsvermittler mit erfolgreichen Anwendungsbeispielen .....                           | <b>21</b> |
| <b>Tabelle 7</b>  | Verwendete Lösungsvermittler mit Konzentrationen.....                                    | <b>22</b> |
| <b>Tabelle 8</b>  | Maximale Fomocain-Konz. [mg/ml] mit diversen Lösungsvermittlern .....                    | <b>23</b> |
| <b>Tabelle 9</b>  | Maximale Fomocain-Konzentration in EV mit $\gamma$ -CD.....                              | <b>25</b> |
| <b>Tabelle 10</b> | Fomocain-Konz. [mg/ml] in 2-HP- $\beta$ -CD verschiedener Substitutionsgrade..           | <b>27</b> |
| <b>Tabelle 11</b> | Dichte, Kinem. und Dyn. Viskosität verschiedener 2-HP- $\beta$ -CD Konz. ....            | <b>31</b> |
| <b>Tabelle 12</b> | Bindungskonstanten des Fomocain im Vergleich.....  | <b>33</b> |
| <b>Tabelle 13</b> | Fomocain-Derivate mit Morpolin-Rest.....   | <b>40</b> |
| <b>Tabelle 14</b> | Fomocain-Derivate mit Diethanolamin-Rest.....  | <b>40</b> |
| <b>Tabelle 15</b> | Löslichkeit der Derivate nach EuAB 1997 .....  | <b>41</b> |
| <b>Tabelle 16</b> | pK <sub>a</sub> -Werte der Derivate .....  | <b>42</b> |
| <b>Tabelle 17</b> | Ionisationsgrad der Derivate bei physiologischen pH-Wert.....                            | <b>43</b> |
| <b>Tabelle 18</b> | Trübungs-pH-Werte der Derivate .....   | <b>44</b> |
| <b>Tabelle 19</b> | Errechnete Wasserlöslichkeit der Derivate .....  | <b>44</b> |
| <b>Tabelle 20</b> | IgP- und IgD-Werte der Derivate.....   | <b>45</b> |
| <b>Tabelle 21</b> | Plasmaeiweißbindung der untersuchten Derivate .....                                      | <b>48</b> |
| <b>Tabelle 22</b> | Verschieden ermittelte Bindungskonstanten .....  | <b>57</b> |
| <b>Tabelle 23</b> | Verwendete Säuren zur Salzbildung.....   | <b>61</b> |
| <b>Tabelle 24</b> | Einwaagen für die Feststoffverreibungen .....  | <b>62</b> |
| <b>Tabelle 25</b> | Mischungsverhältnisse zur Mischmizellbildung aus wäss. und org. LM .....                 | <b>63</b> |
| <b>Tabelle 26</b> | Verwendete Lösungsvermittler mit Konzentrationen.....                                    | <b>64</b> |
| <b>Tabelle 27</b> | Viskositätsbestimmung unterschiedlicher 2-HP- $\beta$ -CD Konzentrationen .....          | <b>77</b> |
| <b>Tabelle 28</b> | Messwerte der Dichtebestimmung.....  | <b>77</b> |
| <b>Tabelle 29</b> | Löslichkeitstabelle nach EuAB 1997.....  | <b>80</b> |
| <b>Tabelle 30</b> | IgP-Werte der Referenzsubstanzen .....   | <b>84</b> |
| <b>Tabelle 31</b> | Temperaturintervalle der DSC-Messungen .....   | <b>85</b> |
| <b>Tabelle 32</b> | Schmelzpunkte der untersuchten Derivate.....   | <b>86</b> |
| <b>Tabelle 33</b> | Potentiometrische CMC-Bestimmung ausgewählter Derivate .....                             | <b>88</b> |
| <b>Tabelle 34</b> | Plasmaeiweißbindung der Derivate .....   | <b>90</b> |

---

|                   |  |            |
|-------------------|--|------------|
| <b>Tabelle 35</b> | Verwendete Lösungsvermittler mit Konzentrationen.....                | <b>99</b>  |
| <b>Tabelle 36</b> | Zusammenfassung wichtiger Parameter aller untersuchter Derivate..... | <b>103</b> |
| <b>Tabelle 37</b> | Verschieden ermittelte Bindungskonstanten.....                       | <b>105</b> |

- 
- 1 Meran 1983, Vorträge des XXI. Internationalen Fortbildungskurses, Band XI, 17
  - 2 Klinikjahrbuch 2002, Universität Gießen
  - 3 Mutschler, E.; „Arzneimittelwirkungen“ 8. Auflage; Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2001)
  - 4 Catterall, W.A., Mackie, K., Local Anesthetics ins Goodman L. S., Gilman, A., 9<sup>th</sup> Ed. McGrow Hill-Health Professions Division New York (1996)
  - 5 Marban, E., Yamagishi, T., Tomaselli, G., F., J. Physiol. 508, 647 (1998)
  - 6 Ragsdale, D.R., McPhee, J.C., Scheuer, T., Caterall, W.A., Science 265, 1724 (1994) et al., 1994
  - 7 Butterworth, J.F., Strichartz, G.R., Anesthesiology 72, 711 (1990)
  - 8 Narahashi, T., Frazier, D.T.; Neurosci. Res. 4, 65 (1971)
  - 9 Strichartz, G.R., Anesthesiology 45, 421 (1976)
  - 10 Hille, B., J. Gen. Physiol. 69, 497 (1977)
  - 11 Villiers, A., Chem. Centrbl., 830 (1891)
  - 12 Schardinger, F., Z. Unters. Nahr.-Genussm. Gebrauchsgegenstände, 865, (1903)
  - 13 Freudenberg, K., Meyer-Delius, M., Ber. Dtsch. Chem. Ges. 71, 1596 (1938)
  - 14 Freudenberg, K., Cramer, F., Z.Naturforschg., 3b (1948), 464
  - 15 Szejtli, J., „Cyclodextrin Technology“, in J.E.D. Davies (Hrsg.), Topics in Inclusion Science, Kluwer, Dordrecht, 1988, 26
  - 16 Bender, M. L., Komiyama, M., Cyclodextrin Chemistry, Springer, Berlin, 1987
  - 17 Abdullah, M., French, D., Robyt, J. F., Arch. Biochem. Biophys. 114, 595 (1966)
  - 18 French, D., Adv. Carbohydr. Chem. 12, 189 (1957)
  - 19 Antenucci, R.N., Palmer, J.K., J. Agric. Food. Chem. 32, 1316 (1984)
  - 20 Bellinger, M.E., Smith, T.G., Read, R., Gopinath, C., Olivier, P., Food. Chem. Toxikol. 33, 367 (1995)
  - 21 Antlsperger, G., In Mins. 6<sup>th</sup> Int. Symp Cyclodextrins, Hedges, A. R., Ed.; Editions de Santé: Paris (1992), 277-283
  - 22 Szejtli, J., Sebestyén, G., Starch/Stärke, 31, 385 (1979)
  - 23 Schmidt, G. in New Trends in Cyclodextrins and Derivatives; Duchêne, D., Ed.; Editions de Santé: Paris (1991), 27-54
  - 24 Frank, D., Gray, J.E., Weaver, R.N., Am. J. Pathol. 83, 367 (1976)
  - 25 Irie, T.; Otagiri, M., Sunada, M., Uekama, K., Ohtani, Y., Yamada, Y., and Sugiyama, Y., J. Pharm. Dyn. 5, 741 (1982)



- 
- 26 Irie, T., Sugi, T., Otagiri, M., and Uekama, K., *J.Pharm.-Dyn.* 7, 24 (Suppl.) (1984)
  - 27 Irie, T., Sunada, M., Otagiri, M., and Uekama, K., *J.Pharm.-Dyn.* 6, 408 (1983)
  - 28 Arima, H., Wakamtsu, K., Aritomi, H., Irie, T., Uekama, K., In Mins. 5<sup>th</sup> Int. Symp Cyclodextrins; Duchêne, D., Ed.; Editions de Santé: Paris (1990), 487
  - 29 Hirotsu, K., Higuchi, T., Fujita, K., Ueda, T., Shinoda, A., Imoto, T., Tabushi, I., *J. Org. Chem.* 47, 1143 (1982)
  - 30 Al-Nakib, W., Higgins, P.G., Barrow, G.I., Tyrell, D.A.J., Andries, K., Bussche, G.V., Taylor, N., Janssen, P.A.J., *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (1989), 522-525
  - 31 Müller, B.W.W., Brauns, U., EP 0149 197 B2, 20.12.1984
  - 32 Uekama, K., and Otagiri, M., *CRC Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems*, 3 (1987)
  - 33 Ueno, A., Breslow, R., *Tetrahedron Lett.* 23 (1982), 3451-3454
  - 34 Gelb, R.I., Schwartz, L.M., Laufer, D.A., *Bioorg. Chem.* 11, 274 (1982)
  - 35 Rong, D., D'Souza, V.T., *Tetrahedron Lett.* 31, 4275 (1991)
  - 36 Canceill, J., Jullien, L., Lacombe, L., Lehn, J.M., *Helv. Chim. Acta* 75, 791 (1992)
  - 37 Takeo, K., Uemura, K., Mitho, H., *J. Carbohydr. Chem.* 7, 293 (1988)
  - 38 Szejtli, J., „Cyclodextrin Technology“, in J.E.D. Davies (Hrsg.), *Topics in Inclusion Science*, Kluwer, Dordrecht, 1988, 48
  - 39 Müller, B.W., Brauns, U., *Pharm. Ind.* 48, 1427 (1986)
  - 40 Thoma, K., Herzfeldt, C.D., Kasper, F.R., *Acta Pharm. Fenn.* 93, 85 (1984)
  - 41 Privatmitteilung von Frau Prof. Dr. K. Westesen, FSU Jena (1998)
  - 42 Rezeptur, Klinikum an der Lahr, München
  - 43 Doenike, M., Kugler, A., Vollmann, N., Suttman, H., Taeger, K., *Anaesthesist* 39, 475 (1990)
  - 44 Doenike, M., Roizen, M.F., Hoernecke, R., Mayer, P., Ostwald, P., Foss, J., *Br. J Anaesth* 79, 386 (1997)
  - 45 Doenike, M., Roizen, M.F., Nebauer, A.E., Kugler, A., Hoernecke, R., Beger-Hintzen, H., *Anesth Analg.* 79, 933 (1994)
  - 46 Brand, N., *DAZ* 4, 251 (1996)
  - 47 Müller, B.W., Albers, E., *J. Pharm. Sci.* 80, 599 (1991)
  - 48 Uekama, K., *Topics in Pharm. Sci.*, 181 (1987)
  - 49 Frijlink, H.W., Franssen, E.J.F., Eissens, A.C., Oosting, R., Lerk, C.F., Meijer, D.K.F., *Pharm. Research* 8, 380 (1991)

- 
- 50 Fleck, C., Wennek-Klose, J., Wange, J., Oelschläger, H., Archives of Pharmacology 369, (2004)
- 51 Scherrer, R.A., Howard, S.M., J. Med. Chem 20, 53 (1976)
- 52 Thoma, K., Herzfeld, C.D., Kasper, F.R., Acta Pharm. Fenn. 93, 85 (1984)
- 53 Pitha, J., Milecki, J., Fales, H., Pannell, L. and Uekama, K., J. Pharm. Sci. 29, 73 (1986)
- 54 Brewster, M.E., Estes, K.S. and Bodor, N., J. Pharm. Sci. 59, 231 (1990)
- 55 Susuki, M., Sasaki, Y., Szejtli, J., Fenyvesi, E., J. Incl. Phenom 5, 459 (1987)
- 56 Glassl, P.; Dissertation, Universität Frankfurt am Main (1995)
- 57 Solvia, M.; Arzneimittel.-Forsch. / Drug Res. , 13 (1963) 517
- 58 OECD Guideline for testing of chemicals, 117, 30.03.1989
- 59 C. Hansch, A. Leo; Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, VII 1979
- 60 Fleck, C., Karge, E., Loy, S., Wennek-Klose, J., Listing, M., Oelschläger, H., Arzneimittel.-Forsch./DrugRes. 53, (3), 221 (2003)
- 61 Loy, S., Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2003

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind.

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. Dres. h.c. H. Oelschläger, Herr Prof. Dr. med. C. Fleck, Herr Dr. rer. nat. T. Unruh und Herr J. Wange.

dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe. Weiterhin haben Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit von mir erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Jena, den

Janett Wennek-Klose

## Lebenslauf

|                      |   |
|----------------------|---|
| Name:                | Janett Wennek-Klose   |
| Geburtsdatum:        | 21.07.1973  |
| Geburtsort:          | Sangerhausen  |
| Familienstand:       | verheiratet   |
| Wohnort:             | 07743 Jena, Telemannweg 7   |
| Staatsangehörigkeit: | Bundesrepublik Deutschland  |
| Kinder:              | Hans Klose, geboren am 25.11.1999<br>Greta Klose, geboren am 10.02.2003   |
| 1980 bis 1986        | Polytechnische Oberschule „Wilhelm Pieck“ in Jena   |
| 1986 bis 1990        | Kinder- und Jugendsportschule „Werner John“ in Jena   |
| 1990 bis 1992        | Erweiterte Oberschule „Sportgymnasium“ in Jena  |
| 1992 bis 1996        | Pharmaziestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena   |
| 1.12. 1997           | Approbation als Apothekerin   |
| 11. 1996 - 04. 1997  | Praktisches Jahr in der DOM - Apotheke Naumburg   |
| 05. 1997 - 10. 1997  | Praktisches Jahr in der Apotheke des Klinikums der FSU<br>Jena  |
| 12.1997 – 11.1999    | Friedrich-Schiller-Universität Jena<br>Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für<br>Pharmazie Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie von Prof.<br>Dr. Dres. h.c. H. Oelschläger                        |
| 10.1999 – 12.2000    | Mutterschutz / Elternzeit   |
| 01.2001 – 12.2003    | Friedrich-Schiller-Universität Jena<br>Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für<br>Pharmazie Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie von Prof.<br>Dr. Dres. h.c. H. Oelschläger / Prof. Dr. J. Lehmann |
| 12.2002 – 12.2003    | Mutterschutz / Elternzeit   |
| seit 01.2004         | Friedrich-Schiller-Universität Jena<br>Anstellung als Apothekerin in der Apotheke des Klinikums<br>Weiterbildung zum Fachapotheker für Klinische Pharmazie  |

Jena, den 10.04.2005